



# Apport de l'élastographie par imagerie des ondes de cisaillement pour l'évaluation de la photo-polymerisation du collagène cornéen

David Touboul

## ► To cite this version:

David Touboul. Apport de l'élastographie par imagerie des ondes de cisaillement pour l'évaluation de la photo-polymerisation du collagène cornéen. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0051 . tel-01204579

**HAL Id: tel-01204579**

**<https://theses.hal.science/tel-01204579>**

Submitted on 24 Sep 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE PRESENTEE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
SPECIALITE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par David TOUBOUL

**APPORT DE L'ELASTOGRAPHIE PAR IMAGERIE  
DES ONDES DE CISAILLEMENT POUR L'EVALUATION DE LA  
PHOTO-POLYMERISATION DU COLLAGENE CORNEEN**

Sous la direction de Nicolas GRENIER

Soutenue le 26 Mai 2014

**Membres du jury :**

Mme. Béatrice COCHENER, PU-PH, CHU de Brest-----Présidente  
Mr. Nicolas GRENIER, PU-PH, CHU de Bordeaux-----Directeur  
Mr. Philippe GAIN, PU-PH, CHU de Saint Etienne -----Rapporteur  
Mr. Cyril LAFON, Dr. INSERM, Université de Lyon-----Rapporteur  
Mr. Jean-François KOROBELNIK, PU-PH, CHU de Bordeaux-----Examineur  
Mr. Jean-Luc GENNISSON, Dr. CNRS, Institut Langevin, ESPCI, Paris-----Examineur

## Remerciements

Pour ce travail éminemment collaboratif,

Je tiens à remercier chaleureusement l'équipe de l'ESPCI et de l'Institut Langevin de m'avoir permis d'intégrer leur pôle de recherche et en particulier le Dr **Mickael Tanter** et le Dr **Mathias Fink** pour avoir accepté une collaboration sur la thématique de l'Ophtalmologie à travers le montage d'une ANR. Leur dynamisme est à mes yeux exceptionnel et incarne certainement ce qu'il y a de meilleur dans le domaine de la recherche et son transfert technologique en France.

Je remercie particulièrement le Dr **Jean-Luc Gennisson** qui fut mon interlocuteur et guide principal dans cette aventure, ses qualités de travail et ses grandes connaissances scientifiques forcent le respect.

Je remercie le Dr **Thu-Mai Nguyen** et le Dr **Jean-François Aubry** pour leur collaboration fructueuse au cours de thèse et leur amitié joviale.

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur **Nicolas Grenier**, qui a toujours été bienveillant et a accepté la responsabilité de la direction de mon travail, malgré mon positionnement atypique.

Je remercie chaleureusement le Pr **Béatrice Cochener** pour avoir accepté d'être membre du jury et pour m'avoir fait l'honneur de me parrainer dans mon chemin universitaire. J'admire profondément ses qualités humaines et professionnelles et lui suis très reconnaissant pour la grande bienveillance dont elle fait preuve à mon égard.

Je remercie le Pr **Jean-François Korobelnik**, pour avoir accepté la rôle de Jury dans cette thèse mais aussi pour son soutien et son engagement pour la suite de mon chemin Universitaire et Hospitalier au CHU de Bordeaux.

Je remercie le Dr **Cyril Lafon** et le Pr **Philippe Gain** de m'avoir fait l'honneur de délivrer leur avis d'expert pour rapporter la qualité de mon travail.

Je remercie le Dr **Krit Moonen** et le Dr **Joelle Amédée** d'avoir accepté de m'inscrire administrativement, sans contre partie, dans leur équipe de recherche afin de permettre de réaliser cette thèse de science dans un cadre Bordelais.

Je remercie Le Pr **Jean-Luc Pellegrin**, doyen de la faculté de médecine de Bordeaux et le Pr **Roger Marthan**, directeur de l'école doctorale de Bordeaux, de m'avoir guidé dans le cursus de la thèse et pour l'étape suivante.

J'ai une pensée particulièrement émue pour mon maître, le Pr **Joseph Colin** qui nous a brutalement quitté l'année dernière, qui fut pour moi un modèle de grandeur et dont la mémoire sera toujours une source d'inspiration dans ma vie d'homme et d'ophtalmologiste. J'espère pouvoir assurer la continuité de son ouvrage au travers le parcours professionnel que je m'efforce de prolonger.

Je remercie les Docteurs **Florence Malet** et **Philippe Sourdille** et **François Salin** pour leur amitié et leurs encouragements assidus.

Je remercie le Pr **Cynthia Roberts** pour son amitié et son aide depuis plus de 10 ans, pour le travail de publication réalisé en collaboration avec l'université de l'Ohio, pour son enseignement sur la biomécanique cornéenne.

Je remercie les animaleries du Pr **Jean-Claude Le Huec** et **Thierry Couffinhal** pour leur aide décisive dans l'hébergement de mon travail expérimental.

Je remercie **Antoine Robinet** pour sa bonne humeur et sa contribution dans ce travail de thèse.

Je remercie le Pr **Pierre Dos Santos**, pour son amitié et pour son aide apporté à l'organisation des mes expérimentations animales.



Je remercie de Dr **François Leger** pour son amitié de longue date, sa collaboration active au quotidien pour les greffes de cornées et pour son travail d'expertise dans cette thèse.

Je remercie la plateforme d'Alphanov, et en particulier **Benoit Appert Collin, Florent Deloison, Emmanuel Chalumeau** et **John Lopez** pour leur aide dans la réalisation de l'interface œil/machine mais aussi pour leur amitié de longue date.

Je remercie Mes collaborateurs Toulousains du Centre National de Référence pour le Kératocône, les Pr **François Malecaze** et **Pierre Fournié**, pour leur amitié et le chemin réalisé ensemble depuis presque 10 ans.

Je remercie **Pierre Roy** pour sa disponibilité et son aide dans le champ de la iontophorèse, nos discussions furent toujours très fructueuses.

Je remercie mes amis **Mickael Haddad, Bertrand Viellerobe, Thierry Navarro** pour leur soutien moral et leur amitié.

Je remercie les sociétés **Horus Pharma** et **Abbott** pour le soutien logistique apporté dans cette thèse.

Je remercie l'**Agence Nationale de la Recherche (ANR)** pour avoir financé ce travail.

## **MICROELASTO** : une bien belle équipe !

Le concept : Complicité – Questionnement – Bonne humeur et cross-linking ...



Plus personnellement,

Je remercie infiniment ma femme **Candice** pour sa patience et son engagement pour supporter les sacrifices quotidiens liés à mon parcours. Notre fille **Adèle** fut pour nous, depuis son arrivée il y a 3 ans, une source d'énergie rayonnante et indispensable pour aboutir cette aventure humaine. Tout mon amour leur est éternellement dévoué.

J'ai une tendre pensée pour le reste de ma famille; en particulier mon frère **Serge**, ma mère **Ida**, ma belle mère **Betty**, ma belle sœur **Frédérique**, mon beau frère **Thierry** et le Dr **Jean Abitbol** qui m'ont toujours soutenu et entouré de leur chaleur humaine.

Enfin, je dédie cette thèse à mon Père, le Dr **Daniel Touboul**, à qui je pense souvent, qui nous nous a laissé sur le chemin de la vie en 2006 et serait certainement fier de cet accomplissement.

---

## Sommaire Global

---

Introduction de la thèse.....	8
Résumé en Français.....	10
Résumé en Anglais.....	11
Chapitre 1: La technologie du <i>Corneal Collagen Cross-linking</i> (CXL) pour le Kératocône..	12
Chapitre 2: Du concept de l'élastographe cornéen à l'évaluation expérimentale de la photo-polymérisation du collagène cornéen.....	83
Chapitre 3: Evaluation par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement de l'efficacité de la photo-polymérisation du collagène cornéen trans-épithéliale assistée par iontophorèse: la quête d'un model expérimental <i>in vivo</i> .....	100
Chapitre 4: Perspectives du transfert technologique de l'élastographie cornéenne par SSI pour les applications cliniques.....	178
Conclusion de la thèse.....	191
Les points forts de la thèse.....	193
Annexes.....	194
- Liste des publications de l'auteur reliées à la thèse.....	197
- Liste des présentations orales de l'auteur reliées à la thèse.....	227
- Reproduction des publications centrales pour la thèse.....	275
- Reproduction des posters reliés à la thèse.....	227
- Compte rendus d'anatomopathologie et d'innocuité.....	230
- Lexique des abréviations.....	247

## INTRODUCTION DE LA THESE

Cette thèse de science porte sur l'application de l'élastographie dans le domaine de l'Ophtalmologie et en particulier sur l'évaluation des variations de la biomécanique cornéenne. Elle fait suite à une longue filiation de travaux initiée depuis le début des années 90 par l'équipe de Mathias Fink, à l'ESPCI puis à l'Institut Langevin (Laboratoire Ondes et Acoustique, ESPCI, Université Paris VII, UMR 7587 CNRS 1503, Paris, France). Ce dernier est actuellement particulièrement spécialisé dans le développement des technologies innovantes portant sur les ondes mécaniques et sur leurs applications dans le domaine de la santé. Référence mondiale en la matière, l'ESPCI a su développer un savoir faire unique dans ce domaine et mener depuis près de 20 ans plusieurs travaux de thèses qui se sont enchaînés sur la thématique de la palpation échographique des tissus biologiques. Le tableau suivant récapitule la chronologie et l'objet de ces différentes thèses successives:

<b>1998</b>	Stefan Catheline	INTERFEROMETRIE-SPECKLE ULTRASONORE: APPLICATION A LA MESURE D'ELASTICITE
<b>2000</b>	Laurent Sandrin	ELASTOGRAPHIE IMPULSIONNELLE PAR ULTRASONS: DU PALPEUR ACOUSTIQUE A L'IMAGERIE ULTRARAPIDE
<b>2003</b>	Jean Luc Gennisson	LE PALPEUR ACOUSTIQUE : UN NOUVEL OUTIL D'INVESTIGATION DES TISSUS BIOLOGIQUES
<b>2004</b>	Jeremy Bercoff	L'IMAGERIE ECHOGRAPHIQUE ULTRARAPIDE ET SON APPLICATION A L'ETUDE DE LA VISCOELASTICITE DU CORPS HUMAIN
<b>2008</b>	Thomas Deffieux	PALPATION PAR FORCE DE RADIATION ULTRASONORE ET ECHOGRAPHIE ULTRARAPIDE : APPLICATIONS A LA CARACTERISATION TISSULAIRE IN VIVO
<b>2011</b>	Mathieu Couade	IMAGERIE DES PROPRIETES VISCOELASTIQUES DU CŒUR ET DES ARTERES PAR ECHOGRAPHIE ULTRARAPIDE ET PALPATION A DISTANCE
<b>2012</b>	Thu Mai Nguyen	ELASTOGRAPHIE HAUTE-RESOLUTION POUR L'EVALUATION DES PROPRIETES ELASTIQUES DE LA CORNEE ET DE LA PEAU
<b>2014</b>	David Touboul	APPORT DE L'ELASTOGRAPHIE PAR IMAGERIE DES ONDES DE CISAILLEMENT POUR L'EVALUATION DE LA PHOTO-POLYMERISATION DU COLLAGENE CORNEEN.

Cette thèse, dédiée à l'application de l'élastographie pour la cornée, est divisée en 4 chapitres comportant les éléments suivants :

- **Chapitre 1 :** Introduction de la technologie du *Corneal Collagen Cross-linking* (CXL) pour le Kératocône (KC) et de la problématique clinique sous jacente
- **Chapitre 2 :** Concept de l'élastographe cornéen par imagerie des ondes de cisaillement et premiers résultats expérimentaux sur les yeux d'animaux.
- **Chapitre 3 :** Cheminement de la recherche expérimentale entreprise pour aboutir à la validation d'un modèle de CXL trans-épithélial assisté par iontophorèse.
- **Chapitre 4 :** Perspectives du transfert technologique de l'élastographie ultrasonore par onde de cisaillement pour les applications cliniques.

# APPORT DE L'ELASTOGRAPHIE PAR IMAGERIE DES ONDES DE CISAILLEMENT POUR L'EVALUATION DE LA PHOTO-POLYMERISATION DU COLLAGENE CORNEEN

## Résumé

Le *cross-linking* du collagène cornéen (CXL) est une cornéoplastie mini-invasive reposant sur un concept biomécanique difficile à objectiver physiquement et dont les preuves de l'efficacité thérapeutique sont d'interprétation complexe. Les principes, les nuances et les résultats du CXL sont colligés dans cette thèse afin de valider l'intérêt du modèle expérimental choisi pour tester la pertinence de notre travail de recherche sur l'élastographie cornéenne par ondes de cisaillement.

Notre cheminement expérimental a abouti au choix du modèle de CXL trans-épithélial (T-CXL) assisté par iontophorèse (I-CXL), réalisé *in vivo*, sur œil de lapin. Les mesures élastographiques obtenues après euthanasie ont ainsi pu démontrer une modification significative du profil d'élasticité de la cornée après CXL, testé successivement de manière dynamique et statique.

Nos résultats confirment donc l'efficacité biomécanique instantanée du I-CXL et donnent une idée plus précise de la valeur de la photo-polymérisation du tissu cornéen isolée des phénomènes liés à la cicatrisation. Les enjeux technologiques de l'élastographe cornéen par analyse des ondes de cisaillement ont pu être définis afin de développer une stratégie de mise en œuvre d'un système pertinent pour la pratique clinique.

## Mots clés

Cornée, Biomécanique, Elastographie, Ondes de cisaillement, Imagerie supersonique, Elasticité, Kératocône, Photo-polymérisation du collagène cornéen (CXL), Riboflavine, Iontophorèse.

## CONTRIBUTION OF SHEAR WAVE IMAGING ELASTOGRAPHY FOR CORNEAL COLLAGEN PHOTO-POLYMERIZATION ASSESSMENT

### Summary

Corneal collagen cross-linking (CXL) is a kind of minimally invasive corneoplasty mainly based on a biomechanical concept, which is very difficult to measure physically, and which the therapeutic efficacy understanding is complex. Principles, different protocols and results are summarized in this thesis in order to illustrate the usefulness of the experimental model chosen in our experimentations about elastographic corneal shear wave imaging.

The pathway of our experimental work have led to the choice of trans-epithelial CXL (T-CXL) assisted by iontophoresis (I-CXL), performed *in vivo*, on rabbits eyes. Elastographic measurements we obtained after animals euthanasia have shown a significant change of the corneal elasticity profile after CXL, successively tested in a dynamic and in a static fashion.

Our results do confirm the biomechanical efficacy of the I-CXL procedure and give a more precise idea of the sole photo-polymerization effect by avoiding any confounding healing concern. Technological issues for corneal elastography with shear wave imaging have been raised in this thesis to develop a realistic strategy for the launch of a clinically useful device.

### Key words

Cornea, Biomechanics, Elastography, Shear wave, Supersonic Imaging, Elasticity, Keratoconus, Corneal collagen cross-linking (CXL), Riboflavin, Iontophoresis.

---

### Laboratoire de rattachement

Unité INSERM 1026  
Bioingénierie Tissulaire (BioTis)  
Directeur de laboratoire : Dr. Joëlle Amédée

---



# Chapitre 1

## La technologie du *Corneal Collagen Cross-linking* pour le Kératocône

---

### Sommaire

I – Introduction.....	14
II - Rappels préliminaires sur la structure de la cornée.....	15
1. Description macroscopique.....	15
2. Description histologique et ultra-structurale.....	16
III - Physiopathologie grandes lignes de prise en charge du Kératocône.....	20
1- Maladie du collagène.....	20
2- Mise en échec de la stabilité biomécanique de la cornée.....	21
3- Une maladie évolutive.....	24
4- Théorie biomécanique du kératocône.....	25
5- Alternatives thérapeutiques.....	25
IV - Principe du <i>Corneal Collagen Cross-linking</i> (CXL).....	27
1- Le collagène du stroma cornéen .....	27
2- Définition du CXL.....	29
3- La molécule de riboflavine.....	30
4- La pénétration de la riboflavine dans le stroma cornéen.....	30
5- Interaction lors de l'association cornée / riboflavine / lumière UV-A.....	33
6- Réalisation pratique du CXL conventionnel (C-CXL).....	35
7- Evaluation clinique du CXL .....	36

8- Evolution vers différents protocoles et implications.....	38
a. CXL accélère (A-CXL).....	39
b. CXL trans-épithélial (T-CXL).....	41
V - Preuves d'efficacité du CXL.....	44
1- Imageries structurales.....	45
a. Histologie.....	45
b. Tests d'inflation hydrique.....	47
c. Microscopie électronique à transmission (MET).....	48
d. OCT et Microscopie optique confocale.....	50
e. Microscopie multi-photonique.....	52
f. Test de digestion enzymatique.....	53
2- Elastographie Cornéenne.....	54
a- Introduction.....	54
b- Elastographie quasi-statique à forte amplitude de déformation : Extensométrie....	56
c- Elastographie quasi-statique à faible amplitude de déformation.....	65
i. Le scanner par microscopie acoustique.....	65
ii. L'imagerie par tomographie à cohérence optique (OCT).....	66
d- Elastographie dynamique par analyse de la propagation d'ondes mécaniques.....	69
i. Principe de l'utilisation des ondes mécaniques pour faire de l'élastographie dynamique.....	70
ii. Elastométrie dynamique cornéenne par ondes de surface.....	72
iii. Elastographie cornéenne dynamique par ondes de cisaillement.....	73
3- Essais cliniques : les preuves d'efficacité sur la maladie Kératocône.....	75
VI - Conclusions du chapitre.....	77
VII – Bibliographie.....	78

## I - Introduction

Le Kératocône (KC) est la maladie de la « défaillance biomécanique cornéenne » par excellence. Elle est considérée comme rare avec une incidence  $< 1$  cas /2000. Il a été démontré sur des cornées atteintes que le tissu cornéen, qui s'amincissait et faisait hernie en avant (ectasie), diminuait progressivement son niveau d'élasticité.<sup>1-2</sup> **Cf. Figure 1.**



**Figure 1:** Exemple de déformation kératocônique (ectasie) avancée (stade 4), avant greffe de cornée. D Touboul.

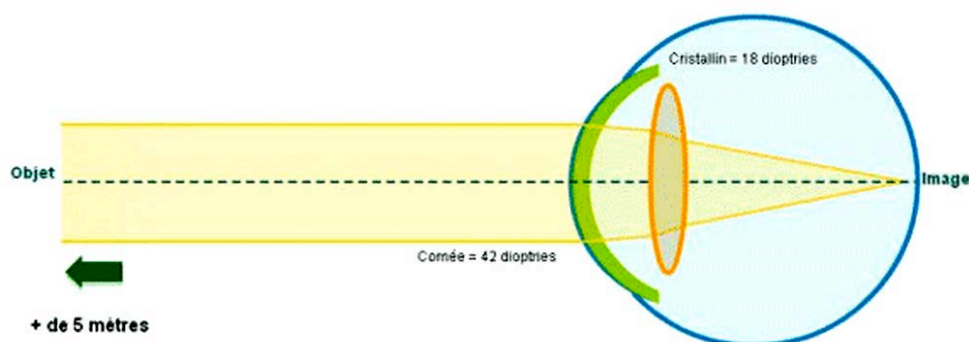
De plus, des cassures de la membrane de Bowman et des défauts d'ancrage des fibrilles ont pu être mis en évidence, laissant penser qu'il y pourrait y avoir un phénomène de glissement des attaches des fibrilles du stroma antérieur sur la membrane de Bowman, secondairement responsable de l'amincissement et de l'ectasie. Des hypothèses génétiques, mécaniques (frottement), enzymatiques (atopie, inflammation) ont été avancées pour expliquer cette dégénérescence structurale. Depuis une dizaine d'années seulement, l'efficacité du traitement photo-polymérisant par *corneal collagen cross-linking (CXL)*, dont la cible privilégiée est le stroma antérieure, apporte une preuve indirecte du tropisme préférentielle de la maladie dans cette zone.<sup>3</sup> La réalisation d'une découpe de la membrane de Bowman et du stroma antérieur lors du LASIK, déclenchant la dramatique ectasie post Laser excimer (EPL), est un argument supplémentaire pour parler de déstabilisation iatrogène de l'équilibre biomécanique liée à l'altération de l'intégrité de la partie antérieure de la cornée.<sup>4</sup> Ce geste étant d'autant plus délétère qu'il est parfois réalisé chez des patients présentant un aspect topographique évocateur d'un KC latent, dit « infra-clinique, » et « suspect », à juste titre. La photoablation

de la surface oculaire (PKR) sans découpe de volet cornéen semble en revanche moins à risque en raison de la formation d'une néo-membrane superficielle, souvent décrite cliniquement sous le terme de « *haze* », et surtout du fait de la moins grande profondeur de section du réseau fibrillaire antérieur. Certaines observations ont même pu suggérer que la PKR pourrait prévenir l'évolution des KC frustes à cause de la suppression de la membrane de Bowman « pathologique » et l'activation des kératocytes superficiels.<sup>5</sup>

## II - Rappels préliminaires sur la structure de la cornée

### 1. Description macroscopique

La cornée est la fenêtre d'entrée transparente de la lumière visible dans l'œil. C'est la partie antérieure de la troisième tunique du globe oculaire (1/6<sup>ème</sup> de la surface totale). Sa forme est elliptique à grand axe horizontal (12 x 10,5 mm en moyenne). La géométrie est asphérique prolate avec un rayon de courbure antérieur de 7,8 mm. La face postérieure de la cornée est parallèle à la face antérieure mais de rayon de courbure postérieur est légèrement plus grand. Son épaisseur moyenne centrale est de 520 microns (+/- 20) et son épaisseur en périphérie peut atteindre 650 microns. En périphérie, la cornée rejoint la zone du limbe et la surface oculaire subit une inflexion de courbure inverse. La puissance réfractive totale de la cornée est de 42 D (48 D pour l'interface avant et - 6 D pour l'interface arrière), soit 2/3 du pouvoir réfractif total de l'œil (pour un œil emmétrope, normalement proportionné). Son indice réfractif moyen est de 1,376. Cf. **Figure 2**.

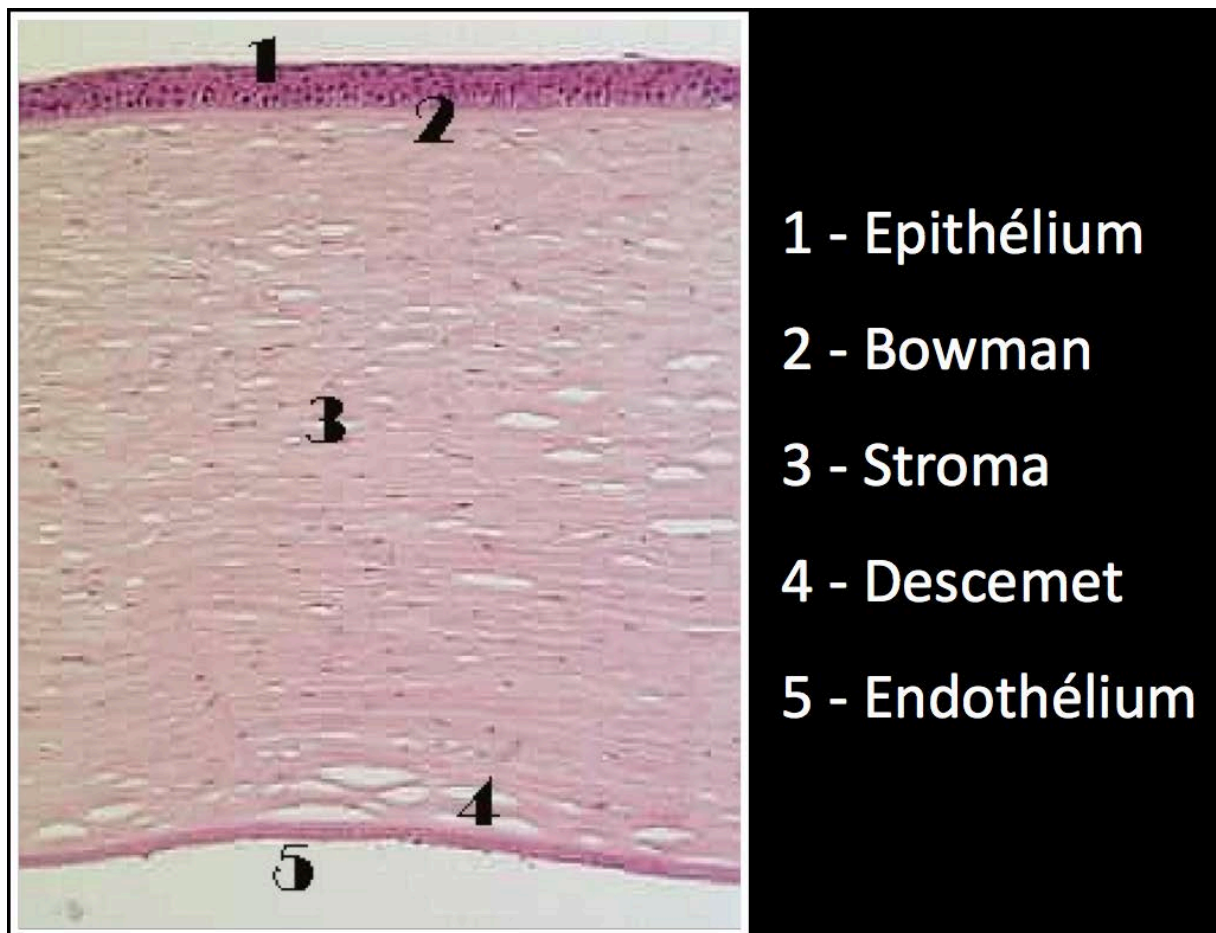


**Figure 2:** Focalisation de la lumière venant d'un point infini et puissances dioptriques de la cornée (42 D). Illustration Wikipedia.

## 2. Description histologique et ultra-structurale

La cornée a une vocation essentiellement réfractive puisqu'elle représente les 2/3 de la puissance optique de l'œil. Malgré sa finesse, la cornée assure cette fonction réfractive de manière particulièrement stable dans le temps. Son amplitude de déformation spontanée est très faible, variant très peu avec les mouvements cardiaques, respiratoires ou palpébraux. La rigidité d'un tel tissu est donc cruciale au maintien de son homéostasie architecturale et fonctionnelle.

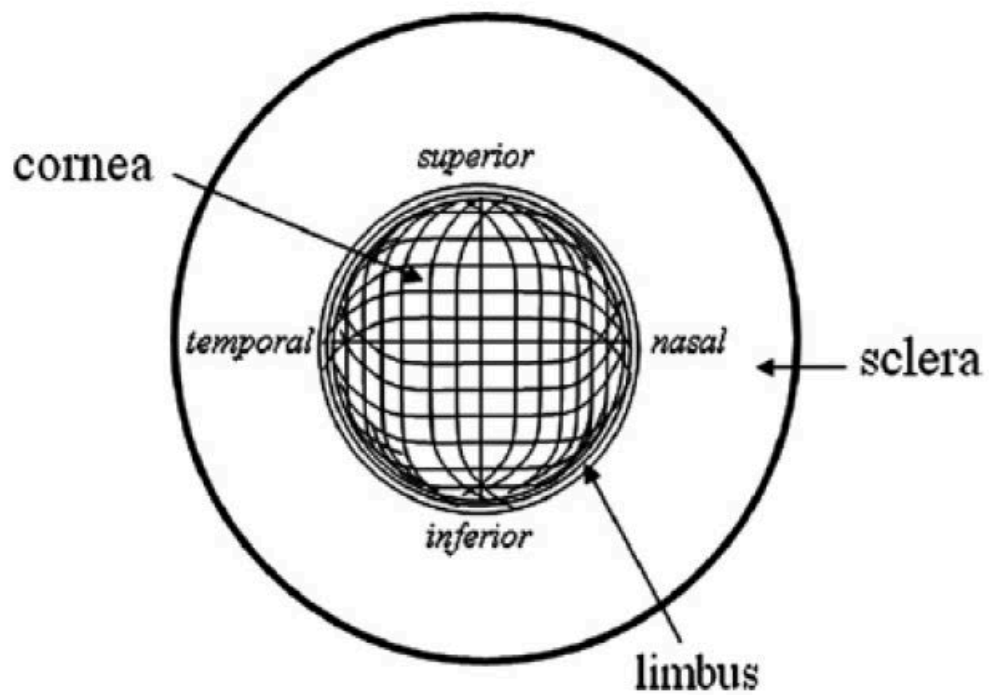
La cornée est aussi un tissu anisotrope unique dans le corps humain constituée à 78% d'eau, de macromolécules de collagène (principalement type I et V) et de substance fondamentale (essentiellement des protéoglycans: decorine et lumican). Sa structure stratifiée est composée de 3 couches délimitées par deux membranes basales, **Cf. Figure 3.**



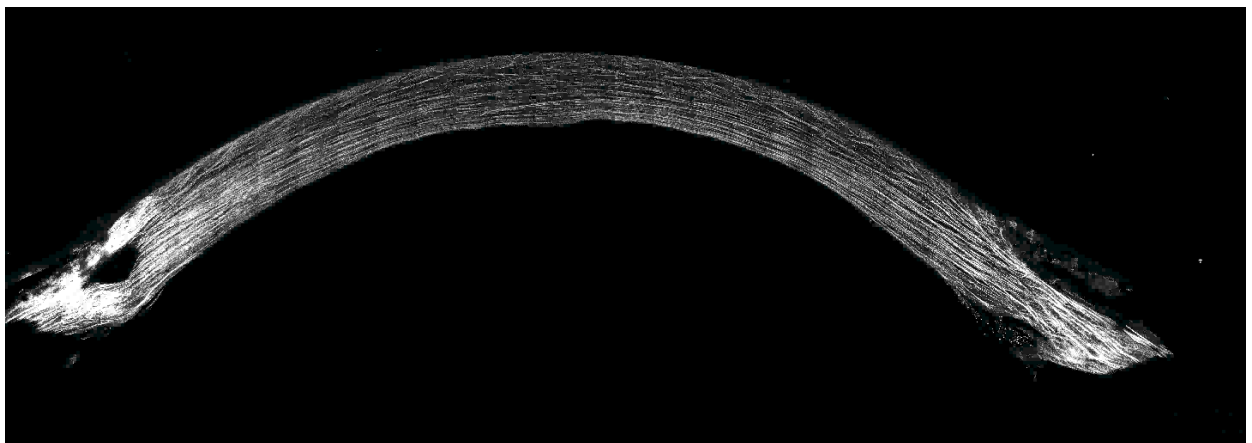
**Figure 3:** Histologie de la cornée humaine. Illustration F. Léger, CHU Bordeaux.

- L'épithélium (10% - 60 microns): pavimenteux et multicouches (5 à 7), régulièrement renouvelé à partir de cellules souches disposées dans les cryptes de Vogt, au limbe. la membrane de Bowman (8 à 14 microns) sert de membrane basale à l'épithélium.

- Le stroma (90% - 430 microns) est constitué de fibrilles de collagène disposées en lamelles orthogonales assurant une structure cristalline et régulière (300 à 500 couches). Celles ci sont plus courtes dans le stroma antérieur par rapport à celles du stroma postérieur (respectivement 0.5-30  $\mu\text{m}$  de long et 0.2-1.2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur versus 100-200  $\mu\text{m}$  de long et 1.0-2.5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur). Son pouvoir oncotique de déturgescence est d'environ 60 mmHg. Les lamelles sont orthogonales entre elles avec des orientations temporo-nasale et supéro-inférieure privilégiées (en regard de l'insertion des muscles droits oculomoteurs). A la jonction limbique, l'orientation des lamelles devient tangentielle et forme le ligament de renforcement péri-limbique. En section transversale, la cohésion des lamelles est plus forte en antérieur. La structuration du stroma est y est organisée en « résille » avec un certain niveau d'ondulation des fibrilles. Dans le stroma postérieur, l'organisation est en « mille feuille » avec des fibrilles bien parallèles entre elles. Par ailleurs, le stroma cornéen est un tissu richement innervé mais totalement avasculaire, son renouvellement est très lent (5 à 10 ans). Comme illustré **Figures 4 à 6**, l'imagerie structurelle est possible par diffraction des rayons X <sup>6</sup> ou par génération de seconde harmonique (SHG) <sup>7</sup>. L'épithélium et la membrane de Bowman et l'endothélium présentent une élasticité très peu significative en comparaison de celle du stroma. En revanche, le stroma qui représente la quasi totalité de la valeur biomécanique du tissu est très peu cellularisé et très organisé. Il peut être décrit comme un hydrogel contenant 78% d'eau, 16 % de collagène et 7 % de protéoglycanes et protéines. Les fibrilles de collagène font 2-3  $\mu\text{m}$  de long and 1.5-2.5  $\mu\text{m}$  de large. Les fibres sont immergées dans une substance fondamentale essentiellement constituée d'eau. Elles sont organisées en trousseau et lamelles (300 à 500) elles mêmes enchevêtrées pour former un réseau quasi cristallin. Cependant, leur orientation est non isotrope, variable du centre à la périphérie et de la surface à la profondeur. La résistance du tissu dans son axe frontal (celui des cordages de collagène) est ainsi bien plus grande que celle mesurée dans son axe sagittal (empilement de lamelles).

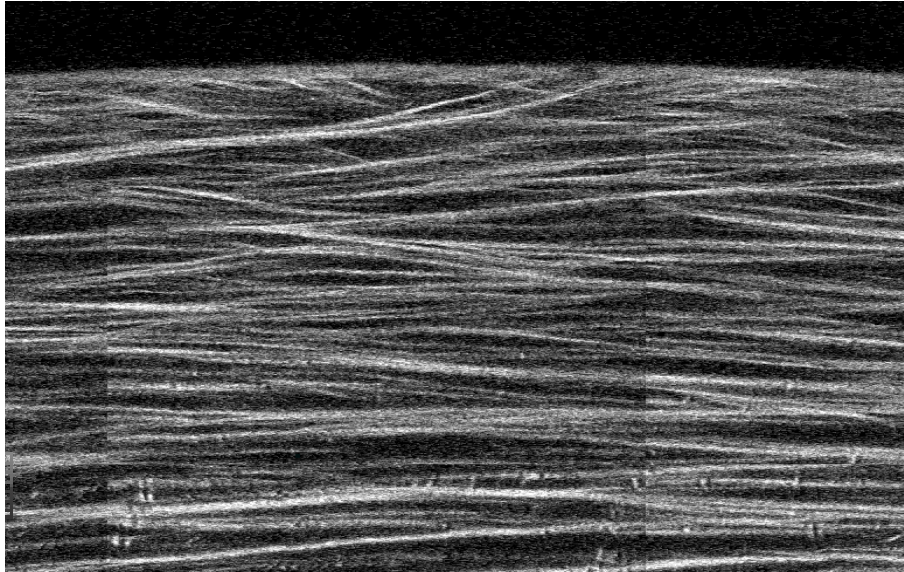


**Figure 4:** Orientation des fibrilles de collagène, observée par diffraction des rayons X. WAXS. Boote et al. 2005.



**Figure 5:** Architecture des fibrilles de collagène de la cornée humaine en coupe. Imagerie par génération de seconde harmonique (laser femtoseconde), reconstitution du champ en plusieurs segments d'imagerie obtenues *ex vivo*. Jester et al. 2011.





**Figure 6:** Illustration de l'ancrage des fibres de collagène superficielle dans la membrane de Bw, vue en imagerie par génération de seconde harmonique (laser femtoseconde), reconstitution du champ en plusieurs segments d'imagerie obtenues *ex vivo*. Jester et al. 2011.

- L'endothélium cornéen (5 à 8 microns) repose sur la membrane basale de Descemet (5 à 20 microns). C'est une couche unicellulaire de cellules hexagonales qui ne comporte jamais de mitose. Elle assure le pompage continu de l'eau qui diffuse passivement des larmes et de la chambre antérieure dans le stroma. La densité de ces cellules décroît régulièrement au cours de la vie à un taux moyen de 0,3 à 0,6% par an. La densité moyenne centrale des cellules endothéliales est d'environ 4000 cell/mm<sup>2</sup> à la naissance.



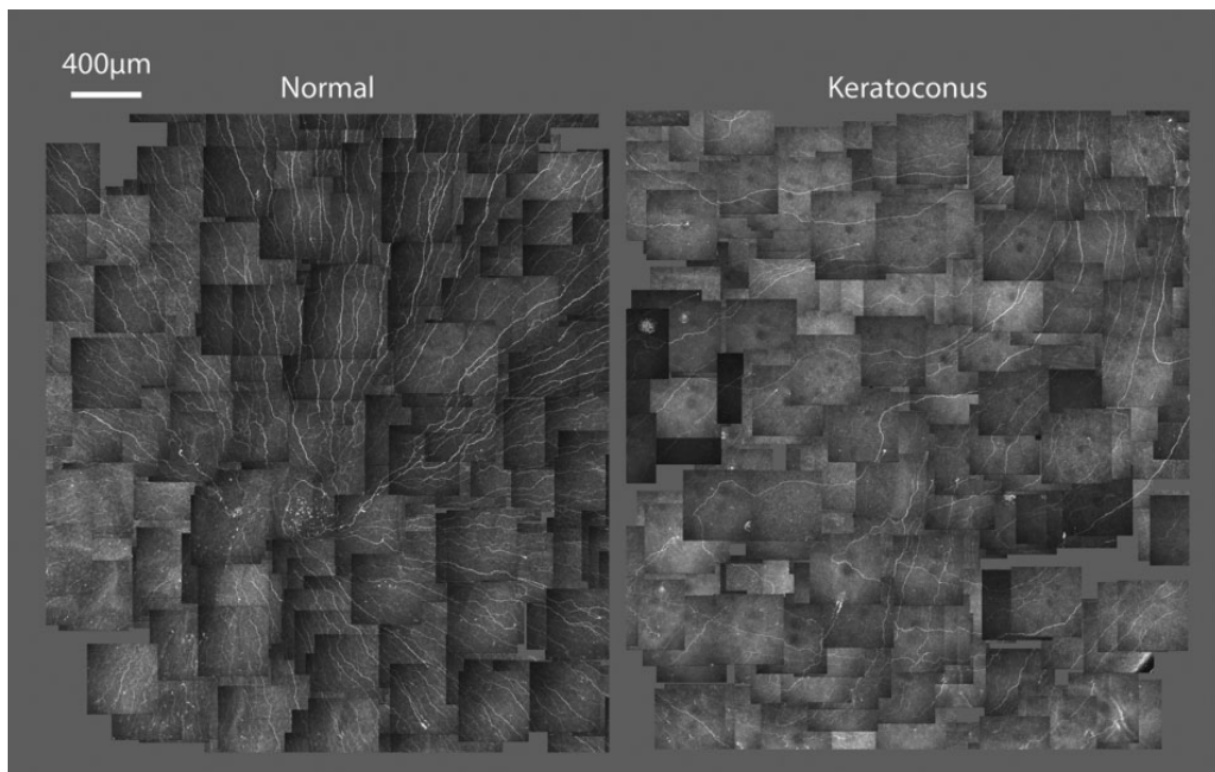
### III - Physiopathologie grandes ligne de prise en charge du Kératocône

#### 1. Maladie du collagène

Le Kératocône (KC) est une maladie rare (< 1 cas pour 2000), actuellement considérée comme une dystrophie cornéenne non inflammatoire et idiopathique.<sup>8</sup> Il existe cependant une forte prédisposition familiale sans que toutefois un gène ou un mode de transmission ai pu être clairement défini.<sup>9</sup> La maladie est réputée associée à nombreuses maladies générales, souvent génétiques (Trisomie 21, amaurose de Leber, Williams Beuren) et en particulier liées à une anomalie du collagène (Marfan, Ehlers-Danlos, etc). Cependant, dans la majorité des cas, le KC n'est pas clairement associé à d'autres troubles imputables à une défaillance généralisée du collagène. Un certain taux de co-morbidité avec des maladies non rares comme le prolapsus de la valve mitrale, l'apnée du sommeil et l'obésité ont pu être incriminées pour expliquer une éventuelle surmortalité (non démontrée) de ces patients devant la constatation empirique de la baisse de fréquentation des patients atteints de KC dans les cabinets d'Ophtalmologie avec l'âge.<sup>10</sup>

Au niveau de la cornée, selon plusieurs voies de recherche, il est difficile de savoir si le problème est lié à un défaut d'ancrage du collagène à la surface cornéenne, à un déficit d'interaction entre le collagène et la substance fondamentale du stroma, à un déficit en kératocytes, ou d'une susceptibilité trop importante du stroma aux enzymes lytiques relarguées dans le film lacrymal. D'une manière plus pragmatique, les anomalies microstructurales les plus reconnues sont les suivantes :

- a. Dysplasie épithéliale compensatrice
- b. Cassure de la membrane de Bowman
- c. Amincissement et déformation focale du stroma cornéen
- d. Défaut d'ancrage des fibrilles de collagène superficielles dans la membrane de Bowman
- e. Diminution de la densité des kératocytes par sur expression des récepteurs à l'IL1, signal d'apoptose<sup>11</sup>
- f. Innervation moins dense et plus tortueuse (sensibilité cependant normale)<sup>12</sup> Cf. **Figure 7**
- g. Pouvoir d'imbibition de la cornée diminué (gonfle moins en présence d'eau)



**Figure 7 :** Plexus nerveux superficiel de la cornée désorganisé dans le cas du Kératocône (image de droite - microscopie confocale). Patel et al.

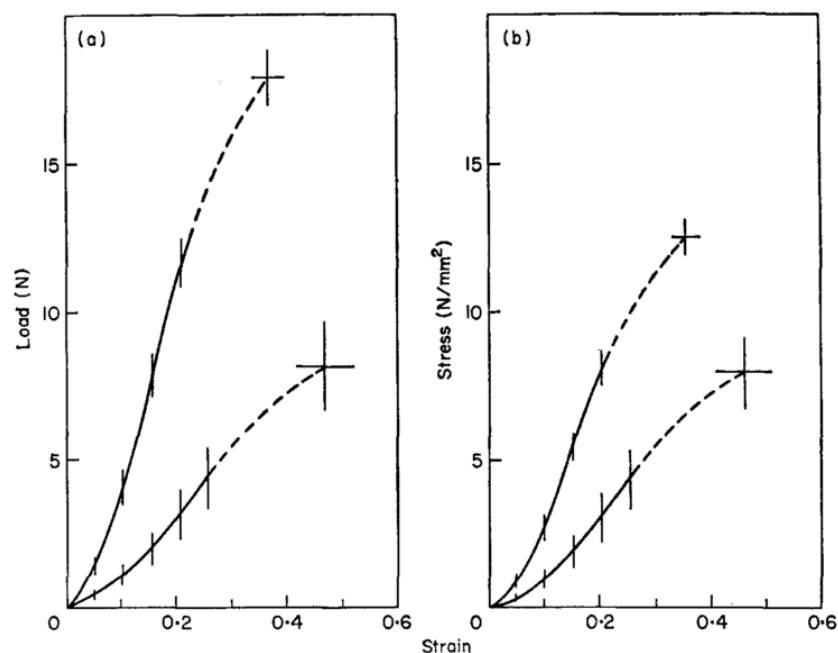
## 2. Mise en échec de la stabilité biomécanique de la cornée

Les contraintes biomécaniques sont permanentes dans la cornée, essentiellement liées aux mouvements oculaires (tractions), au battement de l'articulation palpébrale (cisaillement), aux variations de la PIO (compression). Le KC est globalement le résultat d'une mise en échec du système de régulation de la forme de la cornée soumise à l'ensemble des contraintes répétées. Ce dernier est assuré par un agencement microstructural très précis et progressivement renouvelé dans le temps. Le facteur déclenchant est toujours discuté mais pourrait être inflammatoire, hormonal, métabolique, environnemental, comportemental, iatrogénique ou idiopathique.

Théoriquement, comme décrit plus haut, le KC a une cornée plus molle (déformable – d'élasticité faible) et présente une réponse à la contrainte plus lente que la normalité. L'hystérèse cornéenne est elle aussi diminuée car le tissu ne peut pas absorber correctement l'énergie mécanique déposée (amortissement ou viscosité diminuée).

Assez peu de travaux mesurent la biomécanique de la cornée de patients atteints de KC. Les échantillons obtenus post greffe ou post mortem sont rares. Les deux seuls outils biomécaniques ayant servi à explorer en pratique clinique la biomécanique du KC sont l'*ocular response analyzer* (ORA) et le *dynamic corneal imaging* (DTC - Kératron).<sup>13-14</sup> L'essentiel des publications disponibles sur la biomécanique du KC ont moins de 10 ans et reposent essentiellement sur les constatations de l'ORA. Le nombre de publications sur l'ORA dépasse actuellement les 250 papiers. Il existe en revanche une seule publication faisant état du principe de DTC, utilisant un topographe cornéen spéculaire modifié avec l'implémentation d'une pointe d'indentation centrale mécanique. Récemment le Corvis ST a fait l'objet de quelques publications mais aucune portant sur le KC.<sup>15</sup>

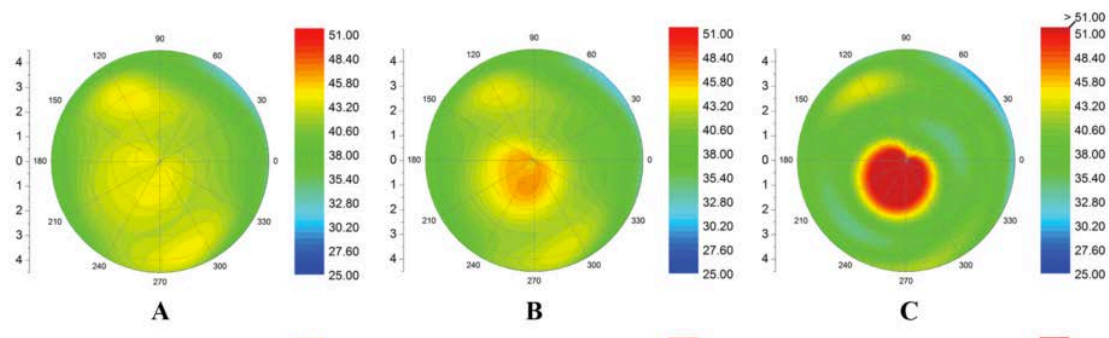
Andreassen fut un des pionniers (1980) dans l'estimation de la biomécanique du KC par extensométrie en démontrant le déficit d'élasticité des boutons cornéens humains obtenu lors de kératoplasties transfixiantes de patients atteints de KC.<sup>1</sup> Cf. **Figure 49**.



**Figure 49:** Courbes contrainte/déformation pour des cornées humaines normales (courbes hautes) ou atteintes de Kératocône (courbes basses). Andreassen et al, 1980.

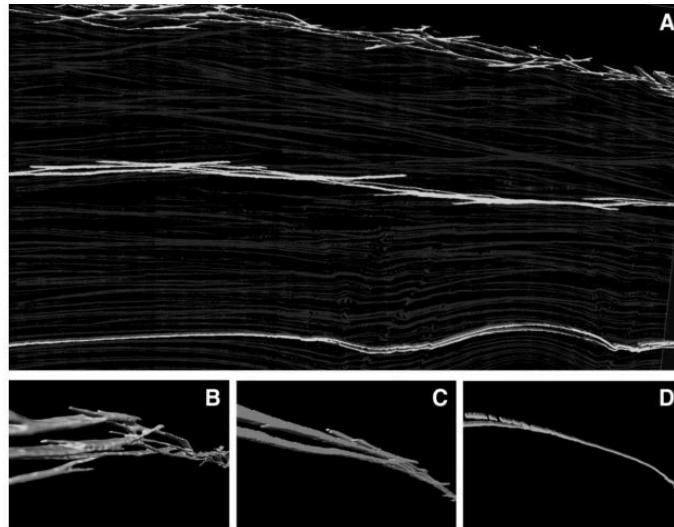
De nombreuses publications ont permis de démontrer l'intérêt de l'ORA pour dépister le KC et suivre sa sévérité.<sup>16</sup> Cependant, à ce jour, la valeur prédictive de l'ORA pour le dépistage du KC n'est pas reconnue comme supérieure à celle de l'analyse morphologique de la forme de la cornée (topo et tomographie). L'ORA ne permet donc pas actuellement de prendre de réelles décisions en pratique clinique. De nombreuses limitations, évoquées plus haut, sont en rapport avec ces résultats. Il ne permet pas en l'occurrence de résoudre le problème inverse, c'est à dire de remonter des informations mesurées aux propriétés physiques de la cornée.

De nombreuses tentatives de modélisation de la biomécanique cornéenne sont disponibles (équipes de WJ. Dupps et de S. Marcos).<sup>17-18</sup> Leur limite est que toute modélisation repose sur des assumptions dont la véracité est parfois non connectée avec les propriétés réelles de la cornée. Il faudrait pouvoir valider les modèles avec l'aide d'un outil clinique, ce qui pour l'instant n'est pas disponible. La modélisation est cependant utile pour essayer de comprendre la genèse de l'ectasie et son aggravation dans le temps. **Cf. Figure 8.**



**Figure 8 :** Simulation à partir d'une topographie d'un patient atteint d'un KC fruste, du développement de la maladie en considérant un affaiblissement de 10, 30 et 45% de son module d'élasticité. (respectivement A,B et C). Topographies illustrées en mode axial en haut, tangentiel en bas. Roy et al, 2011.

Enfin, l'imagerie du déficit constitutionnel ou acquis des embranchements des lamelles de collagène entre elles est une voie de diagnostic, pour l'instant lointaine, cependant très intéressante à explorer, pouvant prédire une éventuelle évolution péjorative du KC.<sup>7</sup> **Cf. Figure 9.**



**Figure 9 :** (A) Illustration de la diminution des interconnexions entre les fibrilles de collagène d'autant plus que l'on regarde les fibres les plus profondes (B à D). Il existe environ 4 fois plus d'embranchements dans le stroma antérieur par rapport au postérieur. Winkler et al, 2011.

### 3. Une maladie évolutive

La maladie est dépistée en général au moment de l'adolescence mais parfois dans la petite enfance (formes sévères) ou plus tardivement dans la vie (formes frustes). Son évolution se fait naturellement vers l'aggravation dont la cinétique n'est pas linéaire. Le KC est réputé d'autant plus évolutif que le patient est jeune et qu'il se frotte les yeux. Cette évolution peut être assez rapide (bombement de plusieurs dioptries kératométriques en 3 mois), soit très lente et même absente après la trentaine.<sup>19</sup> Il existe aussi des cas de régression tardive spontanées. La maladie est toujours bilatérale mais parfois très asymétrique. L'œil le plus sévèrement atteint est souvent associé à un frottement préférentiel, éventuellement lié à la latéralité du patient. Ce frottement, souvent très énergique, est multifactoriel, lié à l'inconfort du patient (amétropie, conjonctivite allergique, instabilité du film lacrymal, fatigue accommodative, dermatite atopique, blépharite chronique). La sévérité de la maladie est quantifiée morphologiquement selon des critères de déformation de la cornée, de transparence des milieux et de retentissement réfractif. La classification de Krumeich est la plus consensuelle et prend en compte la kératométrie centrale, la pachymétrie centrale, la transparence de la cornée et la puissance de la myopisation.<sup>20</sup> La classification de Alio, plus clinique, prend aussi en compte la présence des aberrations optiques de type comatiques.<sup>21</sup>

#### 4. Théorie biomécanique du kératocône

Le *primum-movens* de l'apparition du KC n'est pas établi, cependant il existe des hypothèses impliquant une défaillance localisée de la trame de collagène cornéenne (phénotype possiblement génétiquement prédisposé). L'aspect localisé de cette défaillance biomécanique entrainerait la redistribution progressive et non harmonieuse de la contrainte de mise en tension de la cornée sous l'effet de la pression intra oculaire. Il apparaît donc au niveau de la zone concernée un excès de pression qui entrainerait le glissement des lamelles de collagène, un amincissement et finalement une protrusion (bombement) de la cornée, le plus souvent asymétrique. Un cercle vicieux d'auto-aggravation entrerait en jeu, pouvant aboutir à la rupture de la face postérieure de la cornée (hydrops aigu). Dans cette hypothèse les KC les plus évolutifs devraient être ceux qui présentent une petite taille mais une pente abrupte. L'élargissement du cône pourrait être un mécanisme de stabilisation naturel. Une autre hypothèse pour la stabilisation progressive du KC est le durcissement naturel du collagène avec l'âge ou plutôt la dose cumulative d'exposition aux UV, le KC étant réputé comme peu évolutif après 35 ans. Pour étayer cette hypothèse il a été observé que les diabétiques sont très rarement atteints de Kératocône (la glycation du collagène a ainsi été incriminée). Enfin la vie en altitude et donc la diminution de la pression atmosphérique ( $> 1800$  m) a par ailleurs été proposée comme facteur de risque par certains auteurs (Carlos Arce MD).

#### 5. Alternatives thérapeutiques

La prise en charge du KC a beaucoup évoluée depuis 15 ans. Dans les années 90, il n'y avait pas de traitement proprement dit de la maladie, la prise en charge reposait sur l'éviction des facteurs de risques, l'adaptation d'une aide optique (lunette ou lentille rigide) et éventuellement la greffe de cornée transfixiante. Dès le début des années 2000 se sont affirmées 3 tendances :

- h. L'apparition des anneaux intra-cornéens (AIC) pour limiter ou repousser le recours à la greffe, (Pr. Joseph Colin - 1997)
- i. La diversification des greffes lamellaires profondes pré-descemétiques (KLAP) afin de préserver l'endothélium sain et d'assurer ainsi une plus grande longévité et efficacité des greffons. La découpe des berges assistées par laser femtoseconde apportant un supplément d'efficacité en minimisant les aberrations optiques résiduelles.

- j. Le *corneal collagen cross-linking* (CXL) associé ou non à une photoablation superficielle au laser excimer, afin de stabiliser et d'ajuster partiellement la forme de la cornée.

L'arbre décisionnel de la prise en charge du KC comporte de multiples ramifications, les principaux nœuds des embranchements sont, par ordre de priorité, les suivants :

- 1- Transparence de la cornée** dans l'axe visuel : la KLAP est décidée si la vision ne remonte pas au test du trou sténopéique
- 2- Age du patient et évolutivité de la maladie**
- 3- Confort visuel** du patient en vision binoculaire avec lunettes, asymétrie de l'atteinte
- 4- Amplitude de l'amétropie, de l'anisométrie éventuelle et des aberrations dites d'ordre supérieur** (non corrigeables par des lunettes)
- 5- Tolérance aux lentilles rigides**
- 6- Epaisseur de la cornée au point le plus fin**
- 7- Statut du cristallin et de la rétine** (si myopie forte axiale associée)
- 8- Opérabilité** (si chirurgie envisagée)

L'indication des lentilles rigides reste assez large mais un pourcentage non négligeable de patients (20 à 30%) ne peut pas bénéficier de cette aide qui donne, par ailleurs, les meilleurs résultats optiques. Ainsi, la place des cornéoplasties pour réhabilitation chirurgicale du KC ne cesse de progresser et en particulier avec l'apparition de la possibilité de combinaisons synergiques de plusieurs cornéoplasties dites mini-invasives, souvent séquentielles. On distingue ainsi :

- k. Le CXL
- l. Les Anneaux intra cornéens (AIC)
- m. La photokeratectomie thérapeutique ou réfractive
- n. La thermorétraction du collagène par micro-ondes

Enfin, les indications de KLAP ont totalement supplanté la traditionnelle greffe transfixiante, qui, pratiquée sur des sujets jeunes entraînait le risque d'avoir à regreffer les patients au moins deux ou trois fois dans leur vie. Avec une KLAP bien menée, on peut estimer valoriser le greffon sur de très grandes durées voir à vie, avec un taux de rejet inférieur à 1%. Cependant, compte tenu du coût médico-économique de la greffe et des risques opératoires afférents, cette alternative reste réservée aux échecs ou aux contre indications cornéoplasties dites mini-invasives.

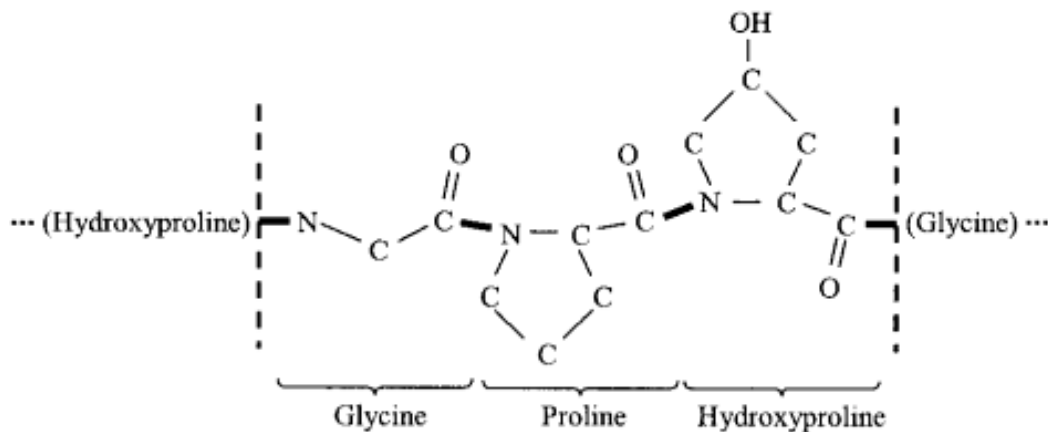
## IV - Principe du *Corneal Collagen Cross-linking* (CXL)

### 1. Le collagène du stroma cornéen

Le stroma cornéen est composé de :

- 78% d'eau,
- De kératocytes (2% du volume tissulaire) et des fibres nerveuses,
- D'une matrice extracellulaire :
  - Polysaccharides retenant l'eau: Glycoaminoglycanes et Protéoglycanes,
  - Protéine de structure : Collagène (70% masse sèche de la cornée), de type I essentiellement.

Le collagène est une macromolécule essentielle dont le schéma répétitif des acides aminés est illustré ci dessous. **Cf. Figure 10.**



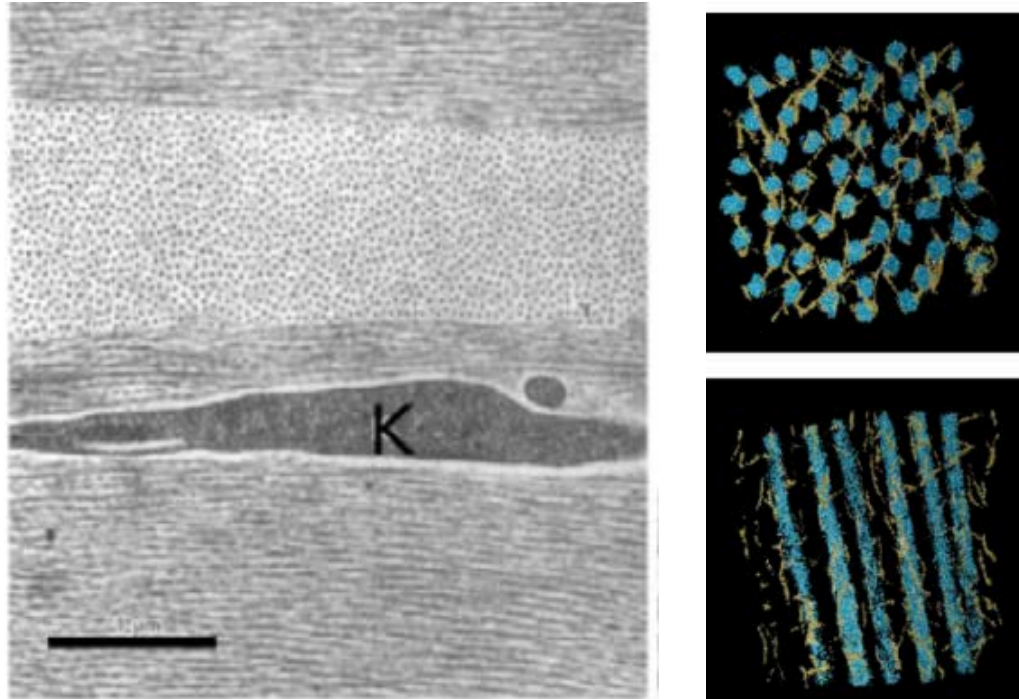
**Figure 10 :** Schéma répétitif de la molécule de collagène. Source Wikipedia.

La configuration spatiale d'une fibrille de collagène est une triple hélice de chaînes alpha.

En microscopie électronique, les fibrilles de collagène I présentent une striation transversale due à l'alternance de bandes sombres et claires (67 nm de périodicité), en raison de l'agencement des chaînes de collagène. Les fibrilles forment ensuite des fibres et des lamelles enchevêtrées (comme détaillé plus haut, chapitre 1, imagerie ultra-structurale).



L'interconnexion entre les fibrilles se fait par le biais des molécules des polysaccharides de la matrice, avides en molécules d'eau, assurant l'espacement régulier des fibrilles entre elles.<sup>22</sup> Le processus de CXL induit une nouvelle réorganisation des interconnexions, resserrant les espaces et augmentant l'ondulation des fibrilles. **Cf. Figure 11.**

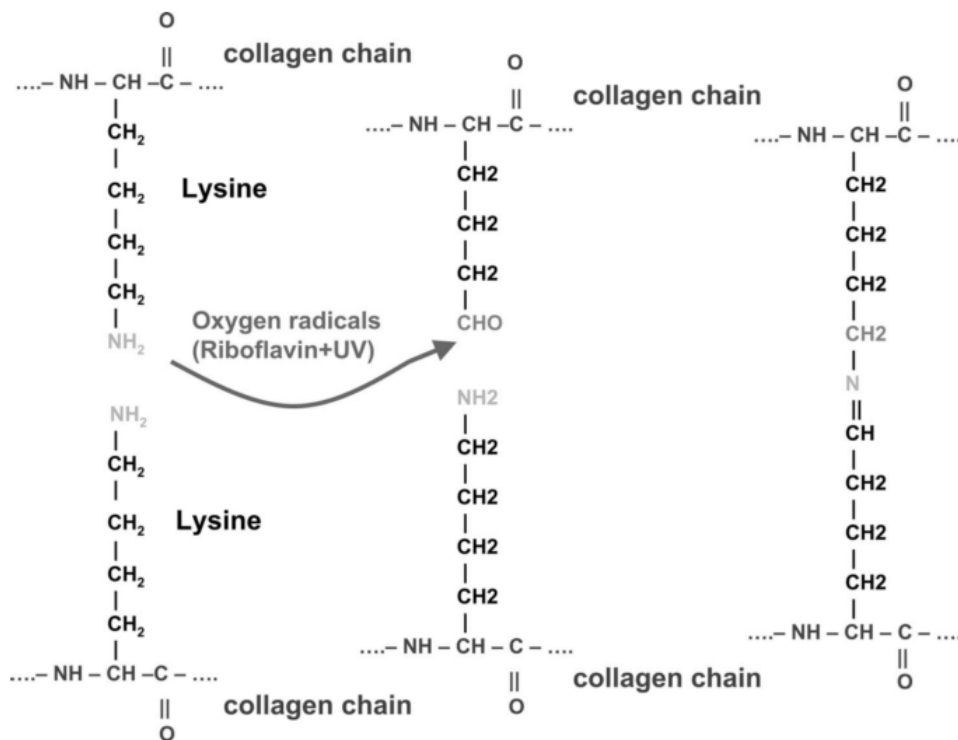


**Figure 11:** Image en microscopie électronique à balayage de la cornée (à gauche) avec simulation en 3D de la configuration spatiale des polysaccharides agencés autour des fibrilles de collagène (à droite). Lewis et al, 2005.

## 2. Définition du CXL

Le CXL est une interaction physico-chimique aboutissant à la photo-réticulation (souvent assimilée à une photo-polymérisation) des molécules de collagène dans leur environnement immédiat. Ceci induit de durcissement biomécanique du tissu exposé. Il s'ensuit une réaction tissulaire dont la vertu est de ralentir le processus d'ectasie des patients atteints de KC. Il faut distinguer l'interaction initiale qui est purement dose dépendante et relativement prédictible de l'effet escompté en clinique qui est largement multifactoriel.

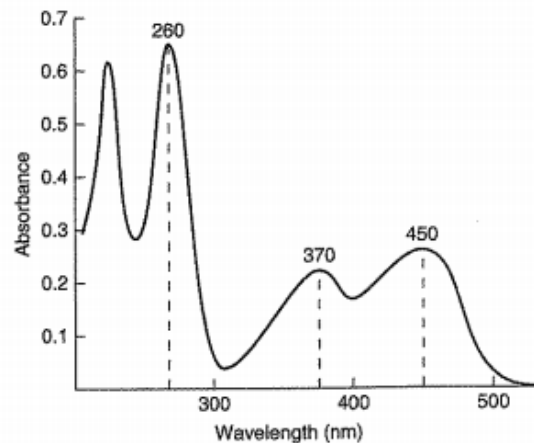
Le mécanisme moléculaire est bien connu, consistant en un pontage des résidus NH<sub>2</sub> (résidu alpha aminé) et CHO (résidu hydroxyallysine) du collagène par le biais de la Lysyl Oxydase, seule enzyme capable de réaliser naturellement le *cross-linking* du collagène. Cf. **Figure 12**. Ce dernier est catalysé en présence de riboflavine à l'état excité par les UV-A.<sup>23-24</sup>



**Figure 12:** Mécanisme moléculaire du CXL par désamination oxydative. Illustration Spoerl et al, 1997.

### 3. La molécule de riboflavine

C'est une macromolécule ( $P_m = 361 \text{ g/mol}$ ), naturellement présente dans l'organisme à l'état de vitamine (B2), précurseur des flavines (coenzymes et nucléotides indispensables au métabolisme cellulaire). Celle-ci est photosensible et absorbe la lumière UV transmissible pour deux pics de longueurs d'ondes principaux (UVB : 260 nm et UVA 370 nm), elle absorbe aussi en pic dans le domaine du bleu (450 nm). La longueur d'onde d'excitation choisie pour le CXL (375 nm) n'est pas la plus intensément absorbée du spectre d'absorption de la riboflavine mais s'écarte du risque d'absorption mutagène, de la faible transmission dans la cornée propre au pic 260 nm, et reste dans le domaine du non visible, contrairement au pic 450 nm. Cf. **Figure 13**.



**Figure 13:** Spectre d'absorption de la riboflavine. Dans la fenêtre biologique passant la cornée, on constate 3 pics à 260 nm (UV-C), 370 nm (UV-A) et 450 nm (bleu).

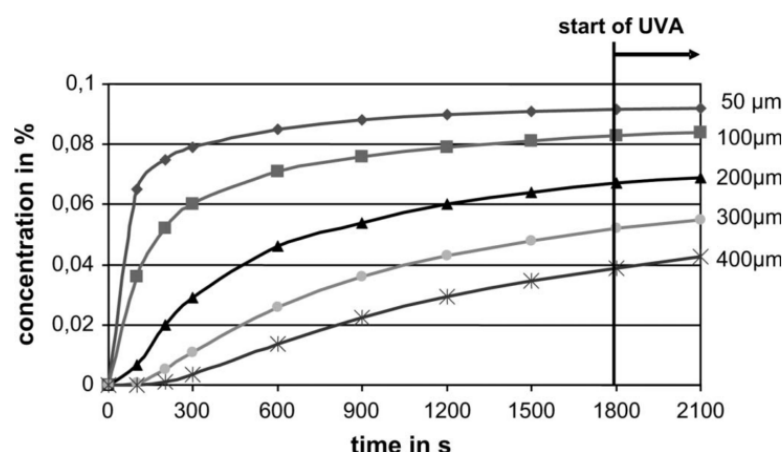
### 4. La pénétration de la riboflavine dans le stroma cornéen

La riboflavine ne passe pas naturellement la barrière de l'épithélium cornéen (jonctions serrées au niveau de la couche basale). Pour diffuser passivement de la riboflavine dans le stroma il faut retirer l'épithélium ou le perméabiliser. Une fois pénétrée dans le tissu elle est « consommée » par l'interaction UV, il faut donc éventuellement recharger pendant l'exposition aux UV si ces derniers sont délivrés trop longtemps afin d'éviter la migration de l'interaction trop en profondeur du tissu. Il a été établi à partir d'expérimentations animales (lapins) qu'une épaisseur cornéenne minimale de 400 microns était nécessaire pour réaliser le CXL sans risque endothélial.

La concentration de la riboflavine dans le stroma antérieur dépend de plusieurs facteurs :

- o. La durée d'application de la riboflavine
- p. La concentration de la solution de riboflavine
- q. La viscosité de la solution
- r. L'association à des macro molécules à pouvoir osmotique comme le Dextran
- s. La présence ou non de l'épithélium,
- t. En cas de respect de l'endothélium, la présence de molécules ouvrant des « pores » dans l'épithélium ou l'établissement d'un champ électrique entrainant la molécule par iontophorèse à travers l'épithélium
- u. La présence ou l'absence de membrane de Bowman (après procédure laser PKT ou PKR)
- v. L'hydratation du stroma
- w. Sa biodisponibilité : c'est à dire sa vitesse d'activation pendant le traitement UV-A qui est une réaction dite « oxygène dépendante »

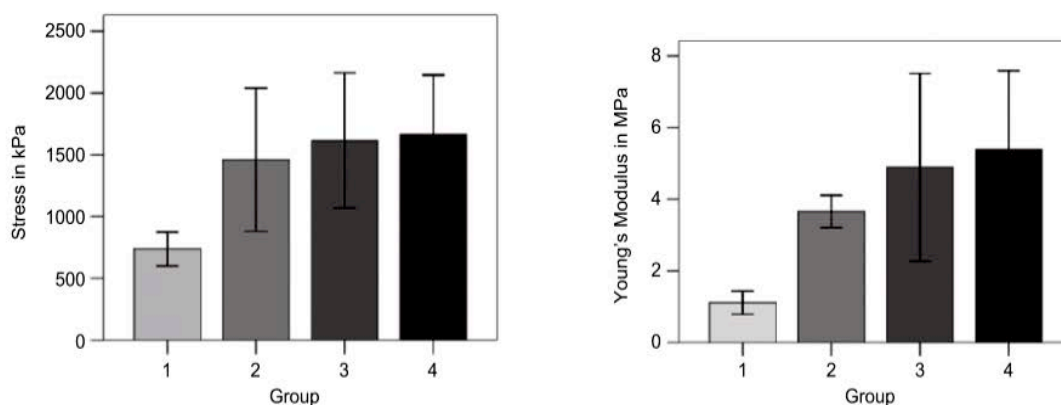
La cinétique de pénétration de la riboflavine est un paramètre majeur pour le succès du CXL. Spoerl et al ont pu définir le temps d'imprégnation minimal de riboflavine 0,1% nécessaire avant de déclencher les UV-A.<sup>25</sup> La concentration de riboflavine fut choisie à 0,1% car au delà elle ne serait pas plus absorbante. Celle-ci fut modélisée comme arrivant à un plateau (entre 50 et 400 microns de profondeur) au bout de 30 minutes. Le gradient des concentrations diminuant de la surface de 0,1% à 0,04% entre la surface et la zone des 400 microns en profondeur (environ divisé par deux). **Cf. Figure 14.**



**Figure 14:** Modélisation de la diffusion de riboflavine en fonction du temps (sans épithélium). La concentration dans le stroma superficiel est stable à environ 0,1% en 30 minutes. Spoerl et al, 2007.

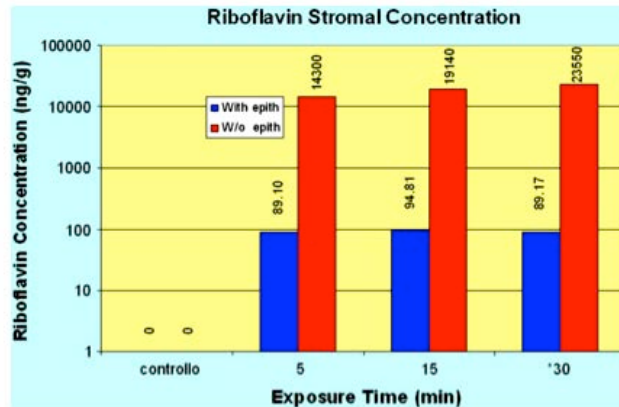
La corrélation entre l'absorption de riboflavine et l'efficacité biomécanique fut testée par Kissner et al, selon différents protocoles de CXL.<sup>26</sup> Montrant bien un très modeste coefficient d'absorption des UV-A lorsque l'épithélium n'était pas enlevé, néanmoins légèrement amélioré lorsque celui-ci était altéré par la présence de BAC (chlorure de Benzalkonium) dans la solution de riboflavine. L'efficacité biomécanique et le coefficient d'absorption des UV-A furent tous deux diminués d'un facteur 5 lorsque l'épithélium était conservé. La présence d'une forte concentration de BAC (0,4%) permettait d'atteindre un niveau similaire d'efficacité. Cependant la mise en pratique de cette toxicité du BAC sur l'épithélium est moins reproductible que lorsque l'on réalise une abrasion systématique. Cf. **Figure 15**.

Group	1 (Intact epithelium)	2 (BAC 0.02%)	3 (BAC 0.04%)	4 (Standard protocol)
Absorption coefficient (mean $\pm$ SD)	8.4 $\pm$ 2.4	30.2 $\pm$ 8.6	35.0 $\pm$ 7.9	42.4 $\pm$ 14.1
Stress-values for 10% strain in kPa (mean $\pm$ SD)	739.0 $\pm$ 136.8	1460.7 $\pm$ 578.9	1614.6 $\pm$ 545.8	1665.5 $\pm$ 478.3
Young's modulus in MPa (mean $\pm$ SD)	11.1 $\pm$ 3.2	36.5 $\pm$ 4.5	48.9 $\pm$ 26.2	54.0 $\pm$ 21.8



**Figure 15:** Taux d'absorption des UV-A (en haut) de 3 protocoles de CXL (3 mW/cm<sup>2</sup>- 30 min) : groupes 2,3 avec épithélium et BAC (Chlorure de Benzalkonium), groupe 4 sans épithélium, versus témoin (groupe 1) avec corrélation de l'effet biomécanique mesuré par extensométrie (en bas). Cornées de lapins traitées *in vivo* et mesurées à J0 du CXL. Kissner et al, 2010.

L'HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) est une technique de dosage *ex vivo* de la concentration de riboflavine dans le tissu cornéen. Dans ces conditions, l'épithélium est souvent de mauvaise qualité, facilitant le passage trans-épithélial de la riboflavine. Cependant, Baiocchi et al ont pu ainsi démontrer que l'épithélium diminuait considérablement la concentration de riboflavine dans le stroma.<sup>27</sup> Cf. **Figure 16**.



**Figure 16 :** Concentration de la riboflavine dans le stroma cornéen (mesurée en HPLC) en fonction de la présence ou non de l'épithélium. L'épithélium réduit la concentration de riboflavine dans le stroma d'un facteur 100. Greffons cornéens humains (receveurs). Baiocchi et al, 2009.

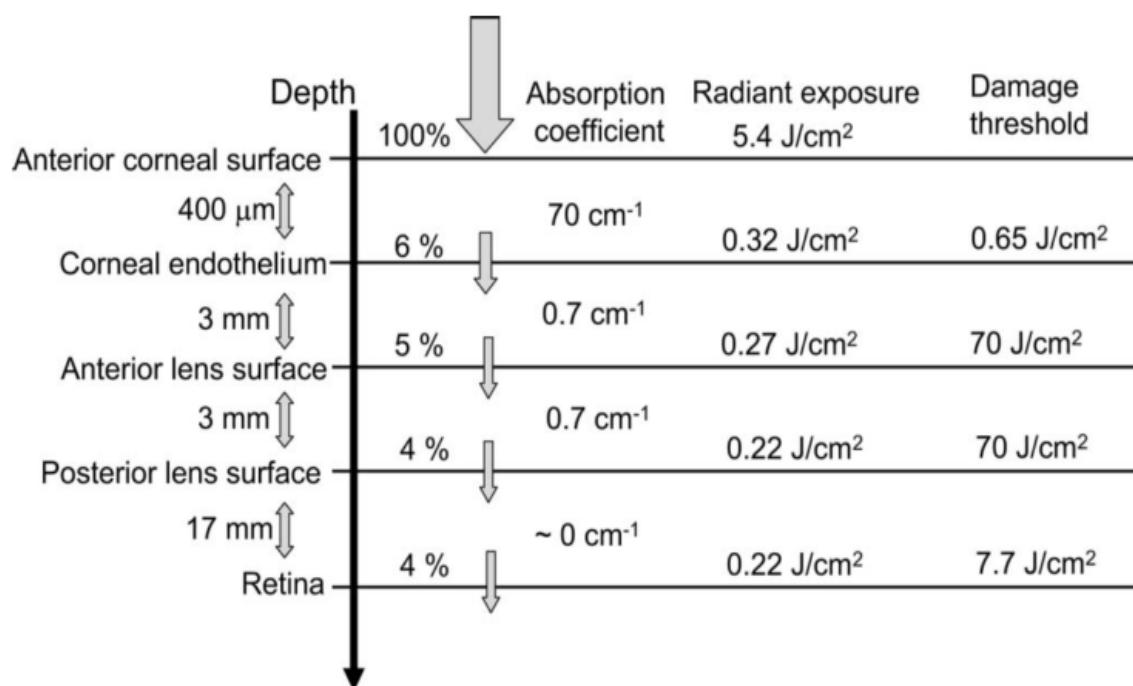
## 5. Interaction lors de l'association cornée / riboflavine / lumière UV-A

Les proches UV-A sont naturellement peu absorbés par la cornée, environ 70% de l'énergie est transmise au cristallin et à l'iris. En présence du pigment de riboflavine, il existe une forte absorption locale et une fluorescence verte. Des radicaux libres sont produits par l'interaction UV-A/riboflavine (anions super-oxyde, oxygène singulet). Ce sont ces radicaux hyper réactifs qui catalysent une réaction de désamination oxydative des molécules de collagène.

Au décours de la désamination, le collagène est plus fortement ponté à la substance fondamentale du stroma cornéen par l'augmentation des liens entre les protéoglycanes et fibrilles de collagène.<sup>28</sup> L'encombrement stérique change aux abords de ces pontages, modifiant la configuration des molécules d'eau. L'indice réfractif, fortement lié au taux d'hydratation, est ainsi localement légèrement modifié. L'intensité et la topographie du CXL est dépendante du gradient d'absorption des UV-A par le tissu, supposé saturé en riboflavine.

La loi d'absorption qui prévaut dans ce cas est celle de Beer-Lambert, prévoyant une décroissance exponentielle de l'absorption avec la profondeur de pénétration. Pour le C-CXL l'irradiance ( $3 \text{ mW/cm}^2$ ) en surface est réduite d'un facteur 5 à la profondeur de 400 microns ( $0,18 \text{ mW/cm}^2$ ). Il y a donc théoriquement une profondeur limite d'interaction difficile à dépasser à condition que le tissu reste saturé en riboflavine. Ceci n'est cependant pas toujours

le cas, d'autant plus que la durée d'exposition UV du C-CXL est longue (dilution passive de la riboflavine, imprégnation inhomogène), que la recharge en riboflavine n'est pas assurée par l'opérateur (*bleaching*/consommation de la riboflavine) et que la lumière est parfois focalisée trop postérieurement (fluence plus forte en profondeur). Dans ces conditions il peut arriver que la riboflavine soit trop concentrée dans la zone postérieure du stroma et plus assez dans la partie antérieure, aboutissant à une absorption privilégiée des UV-A trop proche de l'endothélium. Plusieurs cas d'œdèmes iatrogènes de la cornée avec opacification centrale et perte endothéliale ont ainsi été rapportés. Ces patients ont souvent dû bénéficier de kératoplastie transfixiante secondairement.<sup>29-30</sup> Cf. Figure 17.



**Figure 17:** Normes de sécurité endothéliales et rétinienes évaluées sur œil humain. Avec 5,4 J/cm² délivrés en surface, le seuil de dommage photochimique au niveau endothélial après 30 minutes de riboflavine serait environ 12 fois plus haut que la dose délivrée.<sup>4031</sup> Spoerl et al, 2007.

## 6. Réalisation pratique du CXL conventionnel (C-CXL)

Le CXL conventionnel (C-CXL) est le seul véritablement validé par suffisamment d'études prospectives. Il est réalisé habituellement sous stricte asepsie, au bloc opératoire et sous anesthésie topique.

- x. Le premier temps est la désépithélialisation mécanique de l'épithélium sur les 8 mm centraux de la cornée.
- y. Le deuxième temps est capital dans sa durée car consiste en l'application de riboflavine à la surface de la cornée pendant 20 à 30 minutes, de manière à saturer la concentration du stroma antérieur. Soit une goutte par minute est instillée soit un bain de riboflavine est mis en place dans une lentille d'imprégnation.
- z. Le troisième temps est l'activation de la riboflavine par une lampe UV-A (375 nm) qui entraîne la réaction de photo-polymérisation *in situ*. La fluence dépend de la durée d'exposition désirée (initialement 30 minutes) et la dose est fixée à  $5,4 \text{ J/cm}^2$ , déterminée par les études de sécurité endothéliale. Une goutte de pilocarpine permet de limiter l'ouverture pupillaire pendant les UV.

Actuellement il n'y a aucun moyen de contrôle per opératoire de la concentration de riboflavine dans le stroma cornéen. Le monitoring de l'effet chimique n'est pas non plus accessible. Pour limiter la douleur liée à la désépithélialisation une lentille pansement est posée pendant trois jours. Un traitement à base d'antibiotique (8 jours) et d'anti inflammatoire (1 mois) en collyre est prescrit. Le patient est le plus souvent contrôlé à J1 et J3, puis M1, M6 et 1 an post opératoire.

A noter que les UV-A sont peu absorbés par l'atmosphère, il serait donc judicieux de conseiller le port de lunettes à filtre solaire UV-A efficace dans les 24 heures suivant le CXL, le temps que la riboflavine résiduelle soit évacuée. La lumière bleue est elle aussi susceptible d'activer la riboflavine, un filtre orange-rouge serait pertinent.



## 7 - Evaluation clinique du CXL

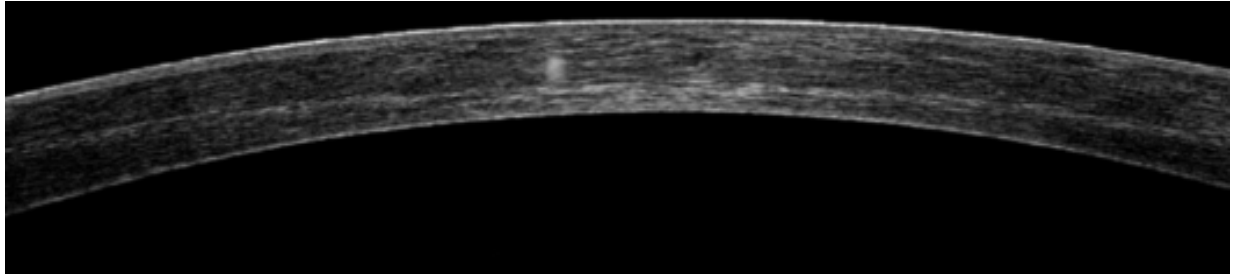
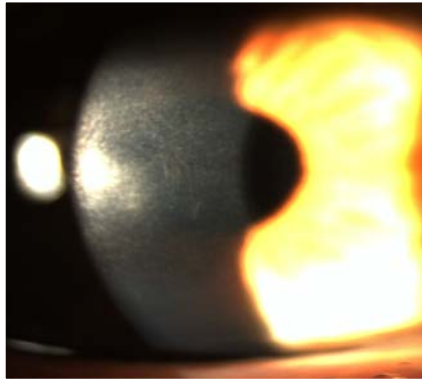
Les indications du CXL ont été abordées plus haut dans le cadre des alternatives thérapeutiques. La réalisation d'un CXL fait l'objet d'une surveillance rapprochée pendant plusieurs années. Les moyens d'évaluation sont d'ordre optiques, biomécaniques et cliniques.

La première semaine de surveillance recherche les complications inflammatoires ou infectieuses, les troubles de la cicatrisation épithéliale. Les complications les plus fréquemment décrites (< 1%) <sup>32</sup> sont:

- aa. infection sous lentille pansement, réactivation virale (HSV),
- bb. voile fibreux dense persistant (haze superficiel ou profond parfois marqué),
- cc. nécrose cornéenne aseptique (amincissement et fibrose, perforation décrite),
- dd. lésion endothéliale (décompensation cornéenne imposant une greffe),
- ee. retard de cicatrisation épithélial.

Aucune lésion du cristallin ni de la rétine n'a pu être déplorée jusqu'à présent.

Du premier au sixième mois c'est l'évolution de l'apoptose des kératocytes qui domine le tableau de surveillance avec l'apparition d'un voile de cicatrisation central ou « pseudo-haze », signifiant pour le clinicien la réalité du CXL.<sup>33</sup> **Cf. Figure 18.** Ce voile correspond à un remaniement du stroma antérieur bien visible en microscopie confocale avec l'apparition de logettes et d'une déplétion kératocytaire transitoire.<sup>34</sup> Les plexus nerveux disparaissent et mettent ensuite plusieurs mois à réapparaître.<sup>35</sup> L'OCT permet de voir une hyper-réflexivité dans le stroma antérieur, relatif à la zone de ballonnisation tissulaire, perturbant la propagation de la lumière infrarouge. Une ligne de démarcation entre la zone affectée et non affectée est souvent visible dès le premier mois post opératoire et témoigne vraisemblablement de la profondeur du CXL.<sup>36</sup>



**Figure 18 : En Haut** - Image du « pseudo haze » (voile de fibrose superficiel) visible à 1 mois post C-CXL. Illustration D Touboul. **En Bas** - ligne de démarcation vue en OCT à 1 mois post CXL. Kanellopoulos et al, 2013.

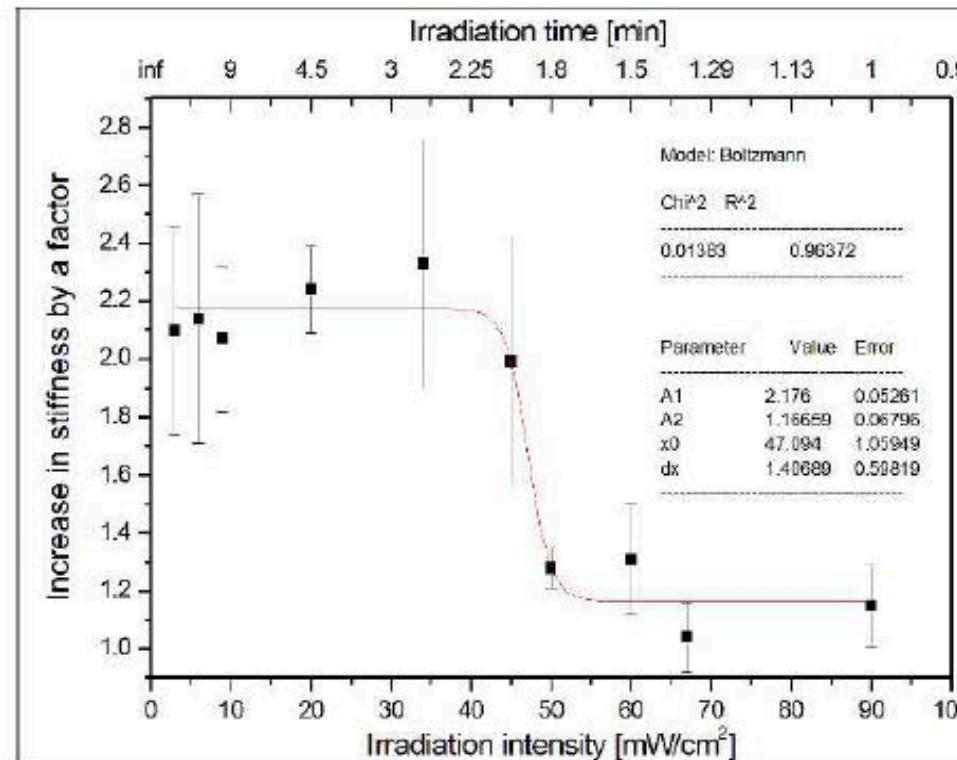
Après le sixième mois, les kératocytes sont de retour dans le stroma antérieur et le pseudo-haze est très atténué. Une très légère diminution de la pachymétrie centrale a pu être constatée, plaidant en faveur d'une compaction du stroma cornéen.<sup>32</sup> Cependant, les variations liées à la qualité de la réépithélialisation peuvent biaiser cette constatation.

L'efficacité clinique du CXL est suivie sur les critères topographiques et tomographiques, ces derniers sont perturbés par l'évolution de la maladie, la ré-épithélialisation, les traitements anti inflammatoires instillés, l'arrêt du port de lentilles rigides (1 mois), l'arrêt des frottements oculaires. Finalement, l'efficacité du CXL est jugée sur sa capacité à stopper ou ralentir la progression du KC (stabilisation clinique). L'interaction élémentaire derrière le CXL est la polymérisation du collagène mais de multiples facteurs entrent en jeu et peuvent influencer le résultat des évaluations. Les étapes de saturation en riboflavine, d'absorption des UV-A et de durcissement tissulaire intervenant successivement sont eux même soumises à différents paramètres de variabilité. Le CXL est donc une interaction complexe dont la compréhension nécessite une maturation globale de différents concepts inter connectés. Toute modification d'un paramètre du protocole thérapeutique induit ainsi des conséquences sur l'ensemble du processus, dont l'évaluation objective n'est pas toujours facilement obtenue.

## 8- Evolution vers différents protocoles et implications

La modification des différents paramètres du CXL aboutit à des effets bien spécifiques :

- ff. Durée d'imprégnation de la riboflavine: c'est certainement le paramètre le plus important car il détermine la biodisponibilité, la profondeur d'interaction et son intensité maximale.
- gg. Dose des UV-A: ce paramètre permet de définir l'intensité du CXL mais n'est valable que pour les zones imprégnées. Sans riboflavine, l'absorption des UV-A dans la cornée est faible ( $< 30\%$ ), les UV-A sont stoppés par l'absorption dans l'iris et dans le cristallin. Le surdosage comporte un risque de lésions endothéliales irréversibles. Les UV-A ne sont toutefois véritablement dangereux que si la cornée est imprégnée en riboflavine. Cependant, la dose maximale d'exposition chronique aux UV officiellement recommandée est de  $1 \text{ J/cm}^2$ , c'est à dire bien inférieure à celle utilisée ponctuellement pendant le CXL.<sup>37</sup>
- hh. Durée des UV-A: la durée est peut importante mais reste limitée par le temps de réoxygénation de la réaction chimique. Une exposition trop courte (moins de 2 à 3 minutes), même intense, ne pourra pas aboutir à une ionisation de la riboflavine équivalente à celle obtenue lors d'une procédure plus longue.
- ii. Irradiance des UV-A: est défini par le ratio Fluence/durée décidé. La loi physique de réciprocité de Bunsen-Roscoe postule que, si la dose d'UV reste constante, la variation de la fluence ne limite pas l'interaction. Il est donc possible de raccourcir le temps des UV à quelques minutes en augmentant proportionnellement la fluence des UV à plusieurs dizaines de  $\text{mW/cm}^2$ . Wernli et al ont décrit une limite de validité de cette loi de réciprocité, au dessus de  $45 \text{ mW/cm}^2$ , l'effet de CXL diminuant dramatiquement (extensométrie, cornée porcine, *ex vivo*).<sup>38</sup> **Cf. Figure 19.**

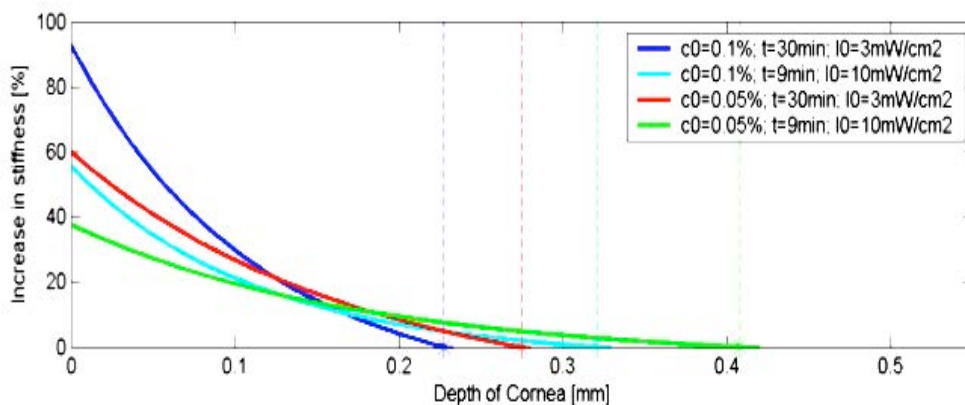


**Figure 19 :** Effet du CXL en gardant une dose constante de  $5,4 \text{ mJ/cm}^2$ , mais en augmentant l'irradiance. Au delà de  $45 \text{ mW/cm}^2$  l'effet biomécanique du CXL disparaît. Wernli et al, 2013.

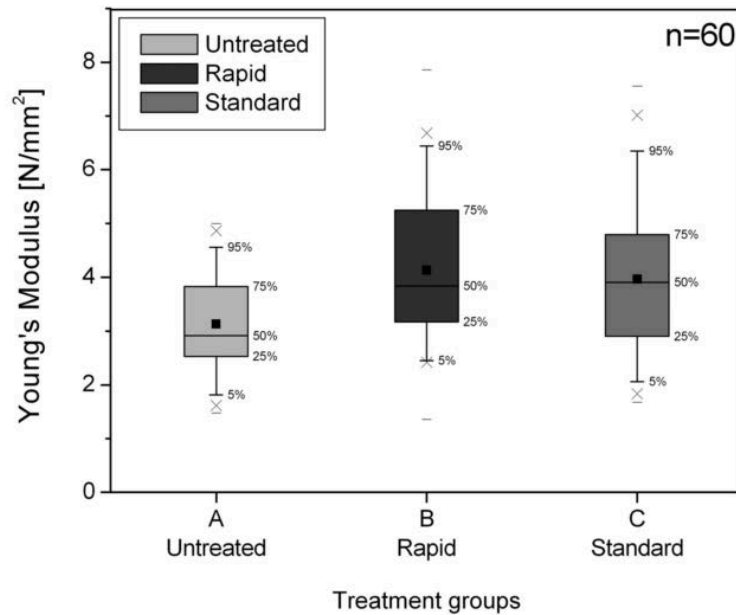
#### a. CXL accéléré (A-CXL)

La durée du C-CXL est d'environ 60 minutes. Elle est jugée longue pour le praticien et le patient. Des procédures gardant la même dose mais augmentant la fluence pour diminuer le temps des UV ont été proposées. Plusieurs équipes décrivent des procédures au moins aussi efficaces d'un point de vue biomécanique mais il n'y a pas encore d'étude clinique comparative (versus C-CXL) publiée avec suffisamment de cas et de recul.<sup>39</sup> Dans ces procédures A-CXL, le temps d'imprégnation à lui aussi été réduit de 30 minutes à 10 minutes, ce qui impacte fortement la profondeur d'interaction et rend difficile la pondération des effets entre le rôle de la diminution du temps d'imprégnation et celle du temps d'exposition. Théoriquement, c'est le temps d'imprégnation qui doit modifier l'efficacité du CXL. Ce dernier doit être au moins supérieur au temps de saturation de la cornée en riboflavine pour ne plus avoir d'impact sur la qualité de la procédure.

Il existe une polémique sur l'équivalence des doses d'UV-A délivrée selon un temps plus ou moins court. Par exemple, est-il équivalent, d'un point de vue physique, de délivrer 30 min d'UV-A à  $3 \text{ mW/cm}^2$  ou 3 min d'UVA à  $30 \text{ mW/cm}^2$ , la dose totale de  $5,4 \text{ J/cm}^2$  restant identique ? La loi physique de Bunsen-Roscoe semblerait confirmer cette équivalence. Dans les faits, certaines simulations semblent contradictoires mais il faut garder en tête que l'expérience clinique ne rend pas compte de l'interaction physique de photo-polymérisation isolée mais de l'ensemble du processus, comprenant la cinétique d'imprégnation et la qualité d'oxygénation de la réaction <sup>40</sup>, différente du modèle conventionnel dans les protocoles cliniques dits « accélérés » disponibles.<sup>41</sup> Cf. **Figure 20**. Les tests biomécaniques d'extensométrie ont en revanche démontré une différence peu significative entre C-CXL et A-CXL.<sup>40</sup> Cf. **Figure 21**. Néanmoins, seuls les résultats de sécurité et efficacité clinique permettront de valider le meilleur chemin. Ces derniers sont trop rares pour conclure actuellement.<sup>39</sup>



**Figure 20:** Modélisation de l'absorption des UV-A en fonction des protocoles C-CXL et A-CXL. Le stroma antérieur devrait être plus efficacement durci par le protocole C-CXL. Schumacher et al, 2012.



**Figure 21:** Comparaison entre le protocole CXL rapide et conventionnel par extensométrie sur cornée porcine *ex vivo*. Le protocole rapide ( $10 \text{ mW/cm}^2$  – 9 minutes UV-A) fut environ 30% plus effectif pour durcir la cornée que le traitement conventionnel ( $3 \text{ mW/cm}^2$  – 30 minutes UV-A). Ce résultat est cependant contradictoire avec le modèle théorique publié par le même auteur en 2012 (Schumacher et al).

### b. CXL trans-épithélial (T-CXL)

La sécurité du CXL serait très grandement améliorée si l'épithélium était respecté. Cependant la difficulté est de faire passer la riboflavine à travers l'épithélium sans le dénaturer définitivement. Plusieurs stratégies ont été envisagées :

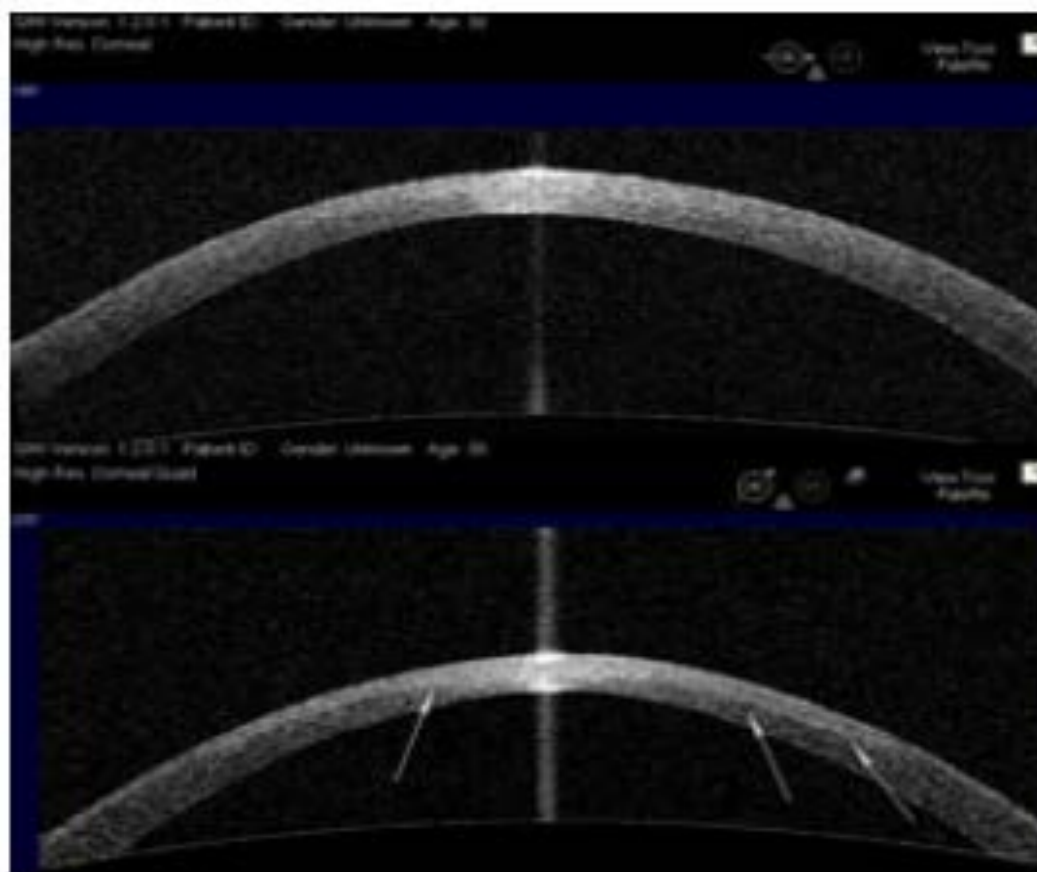
- jj. augmenter la porosité par des substances à toxicité modérées, instillées quelques minutes avant la riboflavine (BAK, EDTA)
- kk. coupler la riboflavine avec un radical favorisant sa pénétration (TRIS)
- ll. utiliser une riboflavine hypo-osmolaire (sans Dextran)
- mm. pousser la riboflavine chargée électriquement à l'aide d'un champ électrique d'intensité constante (iontophorèse).

A ce jour, aucune stratégie n'a prouvé son efficacité pour permettre le passage d'une quantité raisonnable de riboflavine dans le stroma antérieur. Les publications montrent une efficacité clinique modérée de l'approche T-CXL, pour l'instant considérée comme inférieure en

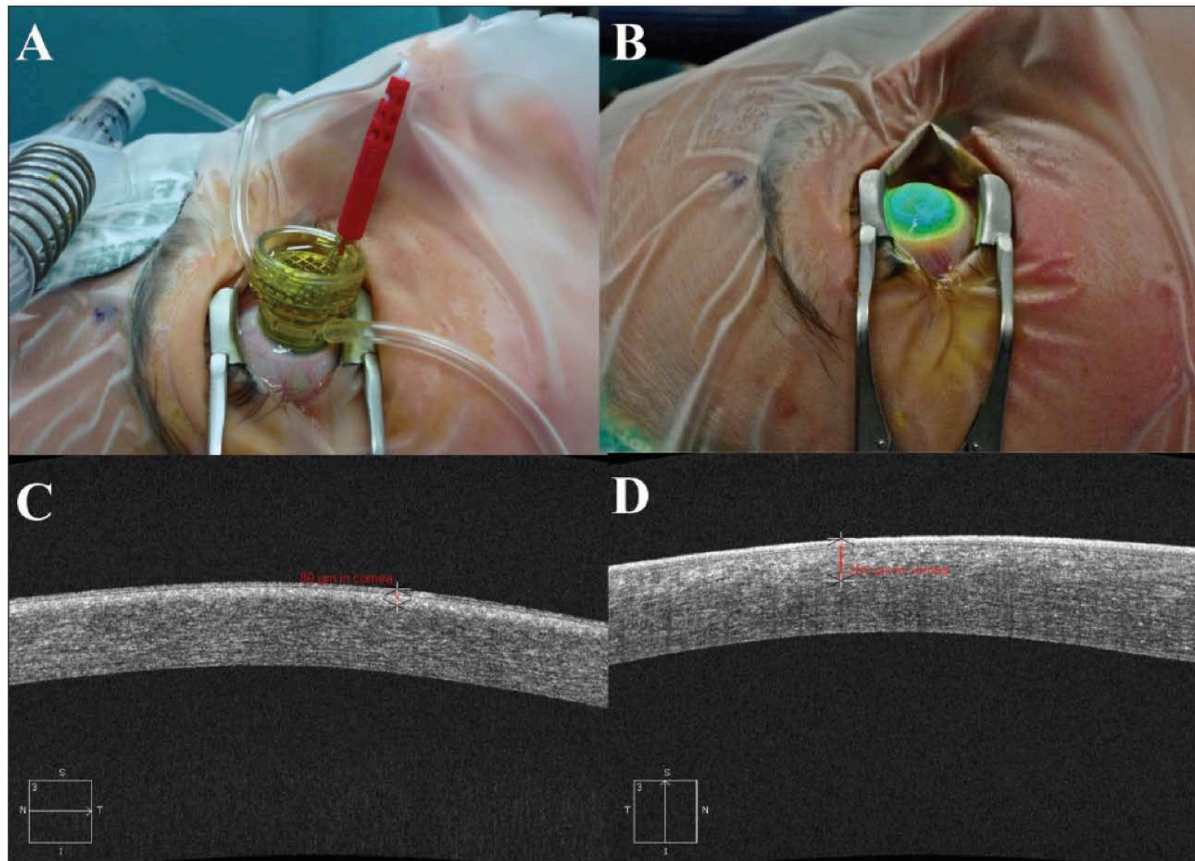
efficacité par rapport au C-CXL.<sup>42-43</sup> La préservation de l'épithélium permettant toutefois de réaliser le CXL sur des cornées plus fines que 400 microns (> 350 microns toutefois).

La iontophorèse est une procédure utilisée depuis de nombreuses années dans diverses spécialités.<sup>44</sup> Elle fut proposée depuis peu pour le transfert trans-épithélial de la riboflavine pour le CXL (concept du I-CXL). Sa validation clinique est actuellement en cours.

Le seul article publié sur la iontophorèse en pratique clinique (n= 22 yeux) montre une ligne d'hyper réflectivité du stroma antérieur en OCT, plutôt superficielle mais relativement encourageante vis à vis de l'application ciblée.<sup>45</sup> **Cf. Figure 22.** Caporossi et al ont communiqué sur leurs premiers cas de iontophorèse, montrant des constatations similaires par pratique d'OCT per-opératoire.<sup>46</sup> **Cf. Figure 23.**



**Figure 22:** Illustration de la procédure de CXL assisté par iontophorèse (Potok-1, Russie). Les images d'OCT à 1 mois post-I-CXL (en bas) montrent un rehaussement de la réflectivité (flèches) dans les 200-250 microns antérieurs par rapport à la cornée en pré-opératoire (en haut). Le suivi clinique de ces patients sur 12 mois montrait une stabilisation des kératométries et l'absence totale de complication. Bilkova et al, 2013



**Figure 23:** Illustration de la procédure de CXL assistée par iontophorèse (Sooft®)(A-B). Les images d'OCT per-opératoire montrent une hyper réflectivité dans les 80 microns antérieurs, plus marquée avec la procédure conventionnelle sans épithélium (C) qu'avec la procédure de iontophorèse (D). Vinciguerra et al, 2013, Poster AAO, non publié.

La iontophorèse pour le I-CXL faisant l'objet d'une description détaillée au **chapitre 3**, nous ne donnerons donc pas plus d'informations ici.



## **V - Preuves d'efficacité du CXL**

Il existe de multiples dispositifs expérimentaux ayant fait l'objet d'essais pour démontrer l'efficacité du CXL. Nous passerons ici en revue les résultats les plus significatifs et l'essentiel des études seront détaillées dans l'ordre suivant :

### **nn. Imagerie structurale**

- Histologie
- Tests d'inflation hydrique
- Microscopie électronique à transmission (MET)
- Diffraction X
- OCT et Microscopie optique confocale
- Microscopie multiphotonique
- Test de digestion enzymatique

### **oo. Elastographie quasi-statique**

- Extensométrie
- Microscopie acoustique (SAM)
- Elastographie par tomographie à cohérence optique (OCT)

### **pp. Elastographie Dynamique**

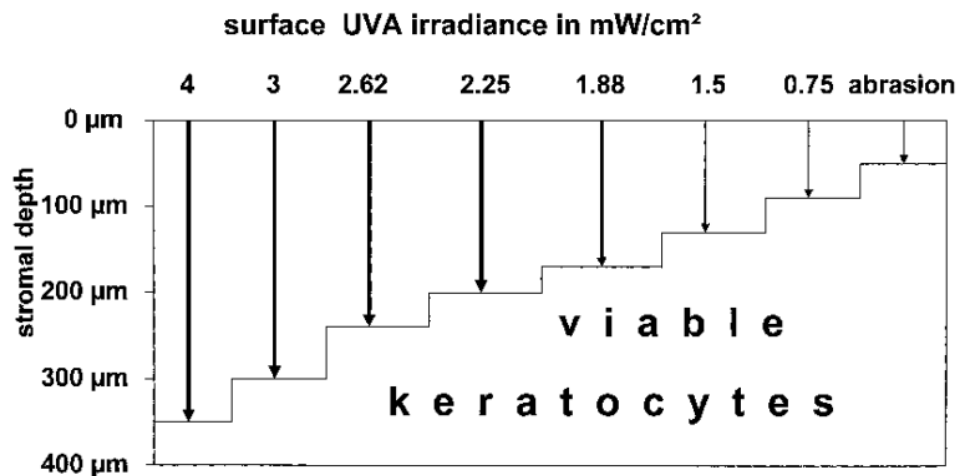
- Imagerie des ondes de cisaillement de surface
- Imagerie des ondes de cisaillement supersoniques

### **qq. Essais cliniques**

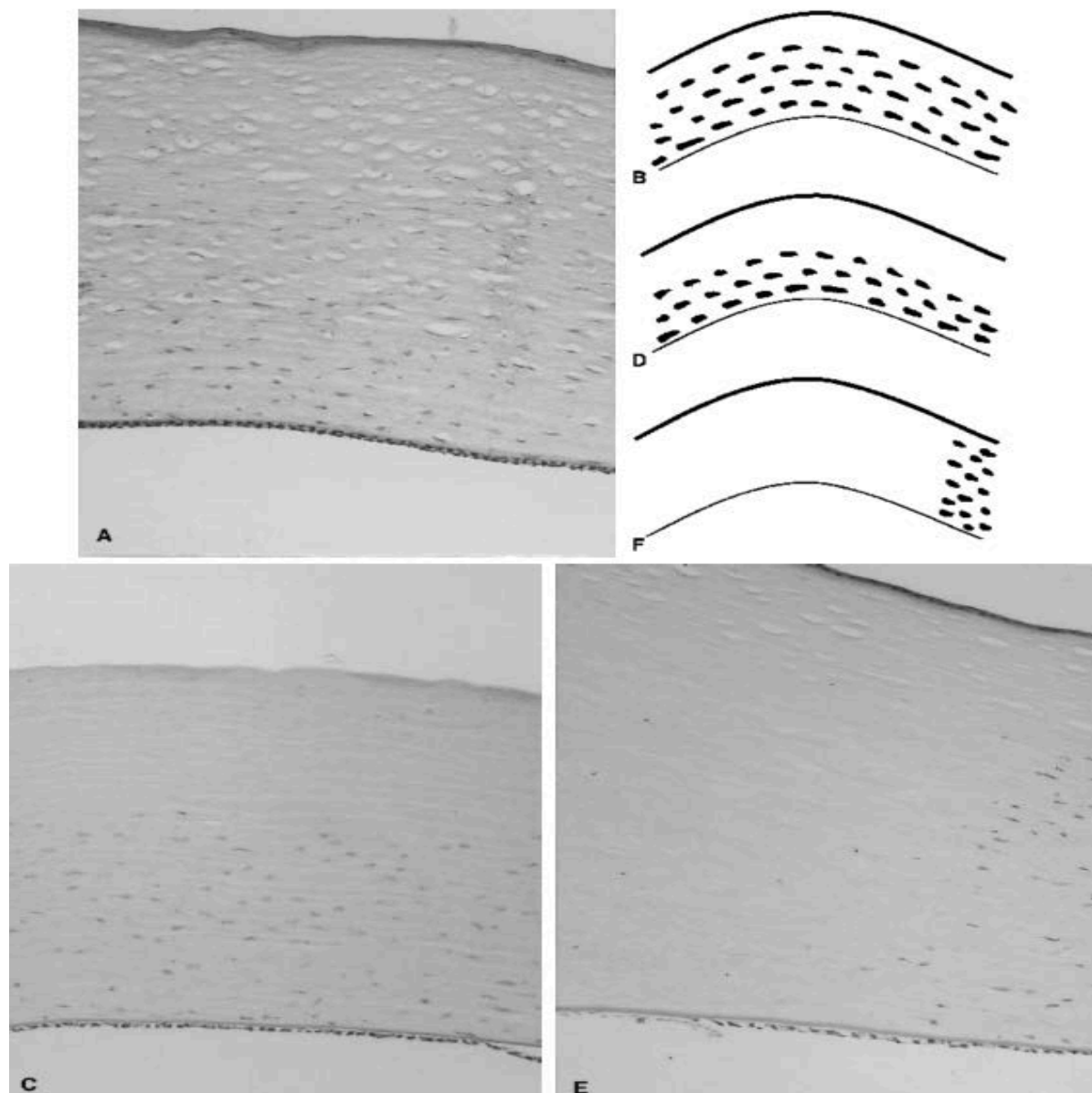
## 1. Imageries structurales

### a. Histologie

Lors des premières expérimentations jetant les bases de la sécurité du CXL et les paramètres clés d'imprégnation et d'irradiance, le concept d'apoptose des kératocytes a été considéré comme le premier témoin histologique de l'effectivité du CXL. La libération des radicaux libres dans le stroma a non seulement un effet sur le pontage du collagène mais objectivement aussi une réelle cytotoxicité sur les kératocytes.<sup>47</sup> Cf. **Figures 24 et 25**. La limite entre l'intensité de l'effet biomécanique et le seuil de cytotoxicité n'est pas bien établie mais la corrélation entre les changements de dureté et la profondeur de la déplétion kératocytaire est vraisemblable.<sup>48</sup>



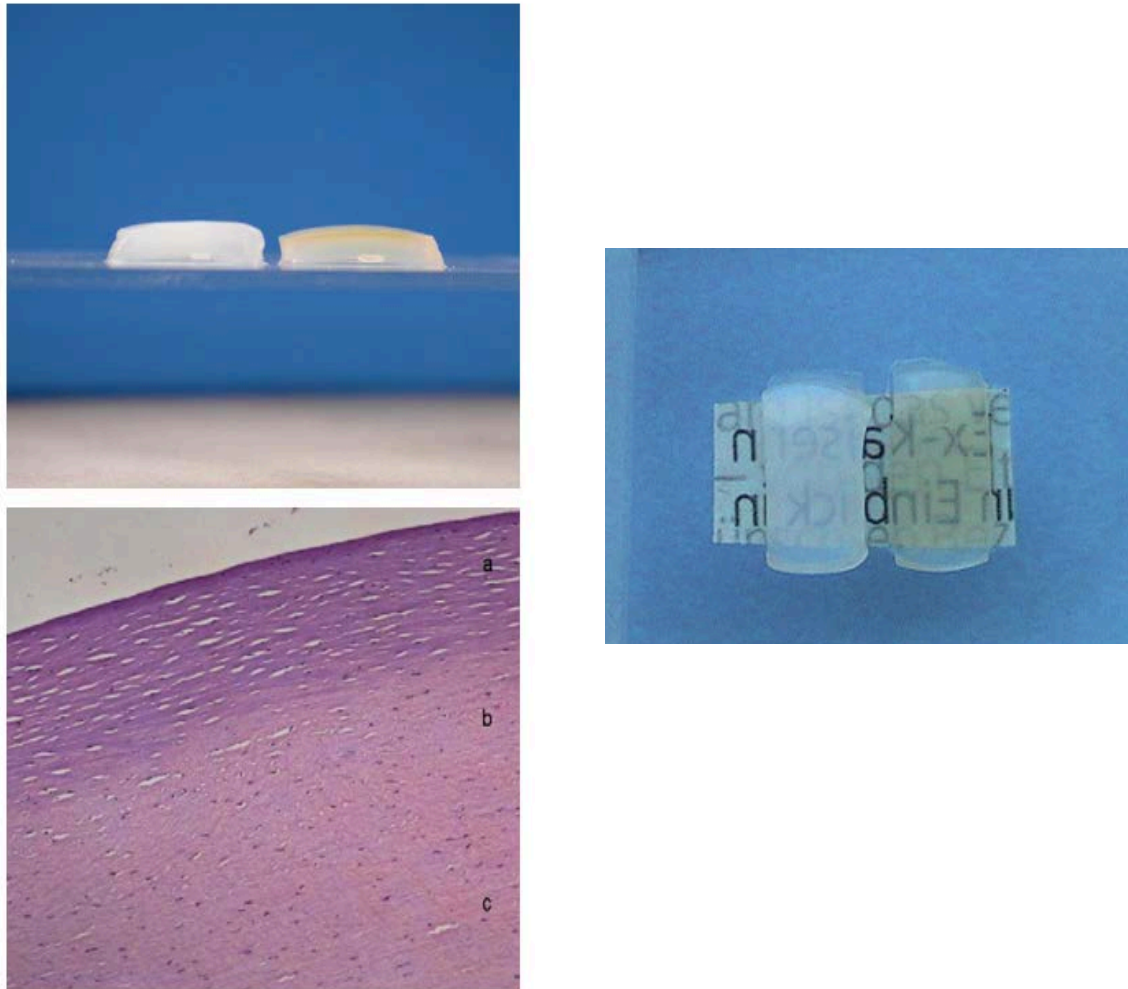
**Figure 24:** Seuils de cytotoxicité kératocytaire en fonction de l'irradiance des UV-A délivrés dans une cornée saturée en riboflavine (établi sur model lapin). En pratique clinique, ce seuil est choisi à 3 mW/cm<sup>2</sup> et impose une cornée d'épaisseur minimale de 400 microns. Wollensak et al, 2004.



**Figure 25 :** L'examen histologique en coloration HAS, montre bien une déplétion kératocytaire majorée en fonction de l'irradiance d'UV-A délivrée (A<C<E: respectivement 0,75, 1,88, 4 mW/cm<sup>2</sup> à 24 Heure post CXL). Wollensak et al, 2004.

## b. Tests d'inflation hydrique

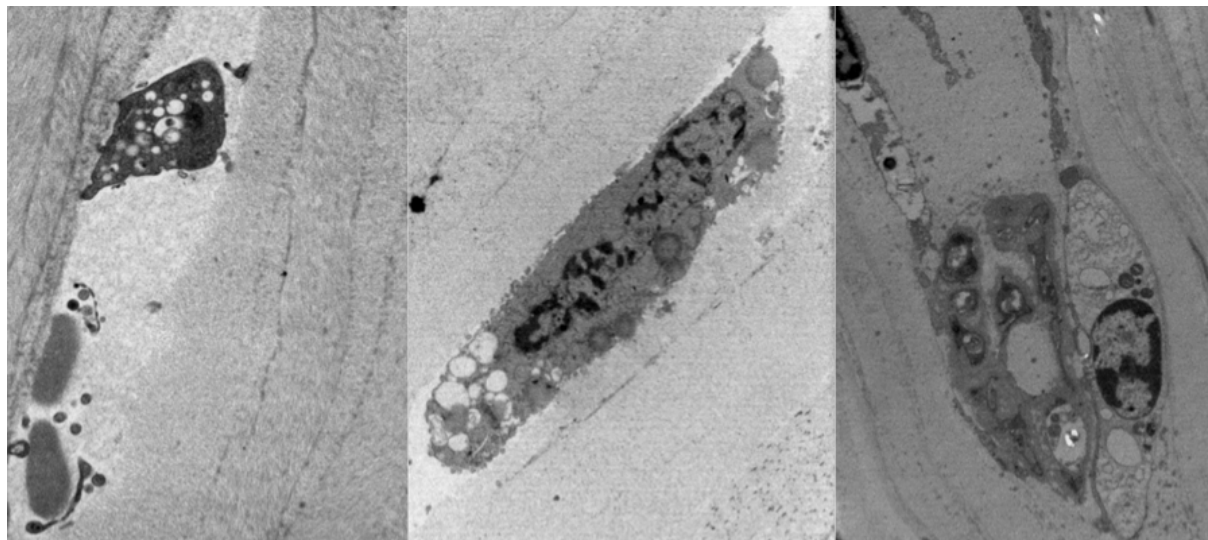
La résistance de la cornée à l'hydratation extrême après CXL, augmentée uniquement dans la partie antérieure du stroma, est un test indirect simple illustrant bien le pontage des lamelles antérieures.<sup>49</sup> Le pouvoir d'éclaircissement de la cornée par CXL a pu être constaté également en clinique avec certaines publications le proposant comme adjuvant à la réduction de l'œdème dans la prise en charge des dystrophies endothéliales.<sup>50</sup> **Cf. Figure 26.**



**Figure 26:** La cornée de droite est celle avec CXL, la cornée de gauche est le contrôle. Après CXL et 24 H de stockage dans une chambre humide, les cornées avec CXL sont plus transparentes et moins épaisses (modèle porcin *ex vivo*), la présence des fentes claires en histologie signent l'absence d'œdème dans la partie antérieure de la cornée (zone a), à la différence des zones de stroma moyen et postérieur, peu affectées par le CXL (zones b et c). Wollensak et al, 2007.

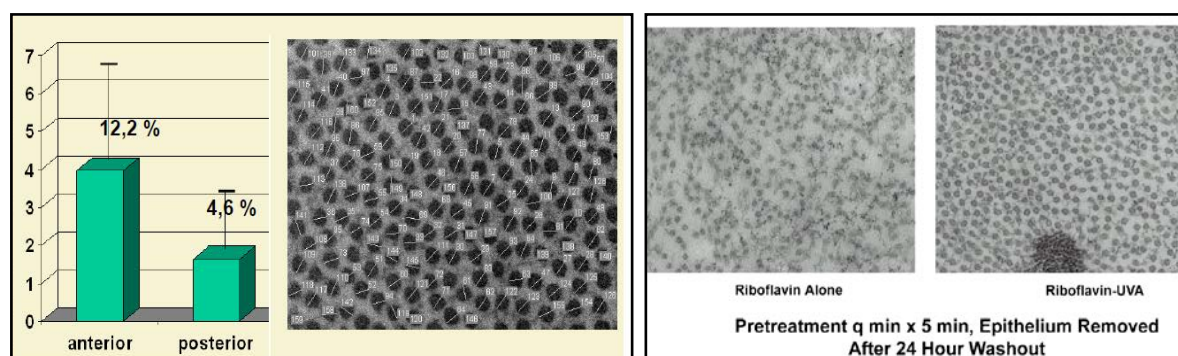
### c. Microscopie électronique à transmission (MET)

La MET a permis d'objectiver les signes intra cellulaires de mort programmée des kératocytes exposés au CXL. <sup>51</sup> Cf. Figure 27.



**Figure 27:** Condensation de la chromatine, rétraction cellulaire, présence de corps apoptotiques diminuant avec la profondeur des kératocytes, de gauche à droite : 100, 300 et 450 microns (G X 10000). Dhaliwal et al, 2009.

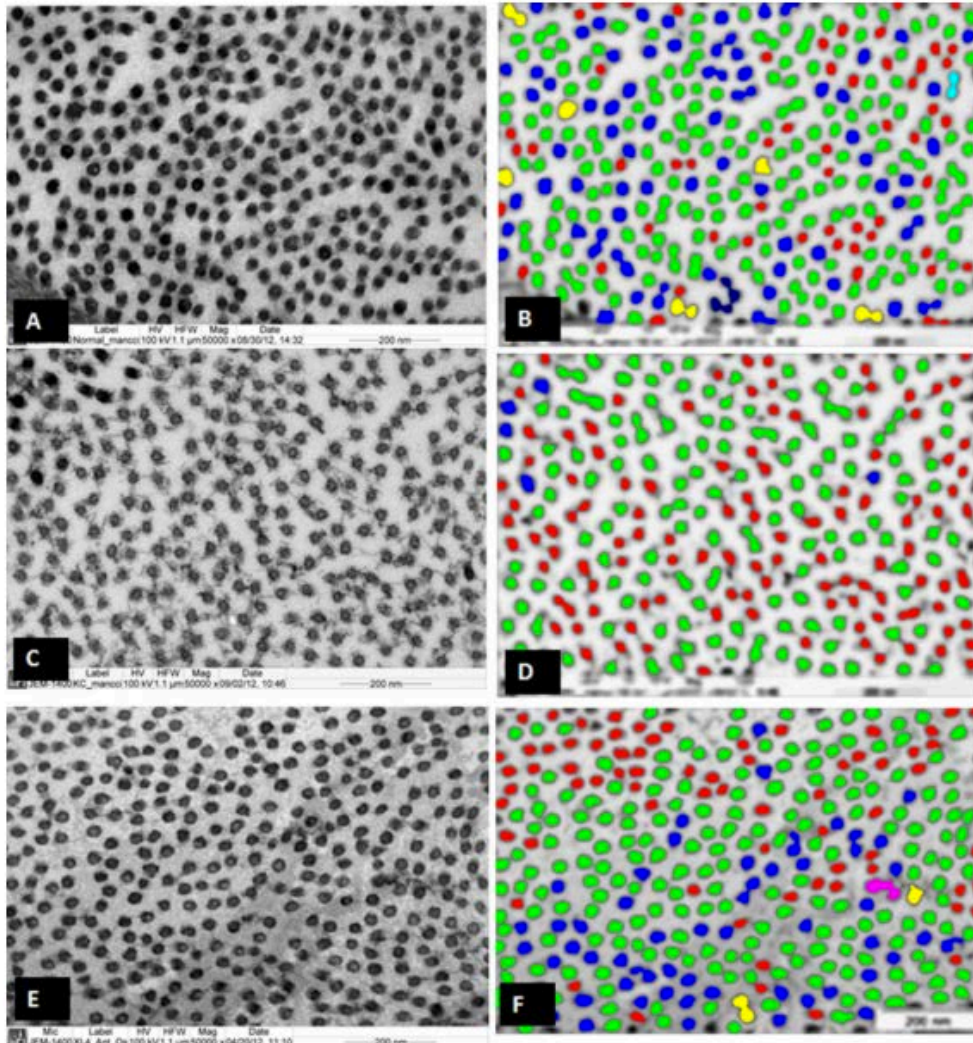
Un argument morphométrique fort est le changement de l'organisation des fibrilles du stroma antérieur. Vu en MET, l'ordre des fibrilles de collagène a pu être amélioré et le diamètre des fibres sensiblement augmenté. <sup>70 52</sup> Cf. Figure 28.



**Figure 28:** Illustration du « gainage » des fibrilles de collagène prédominant dans la partie antérieures du stroma, et de l'augmentation de « l'entropie » des fibres (ordre) après CXL. G X 70000. Cornées de lapins *ex vivo*. Wollensak et al. 2004.



Une étude, menée par Akhatar et al (2013)<sup>52</sup>, sur des boutons receveur de greffes de cornées pour Kératocône, confirme un certain niveau de réorganisation spatiale des fibrilles de collagène dans la partie antérieure du tissu après CXL. Cf. Figure 28.

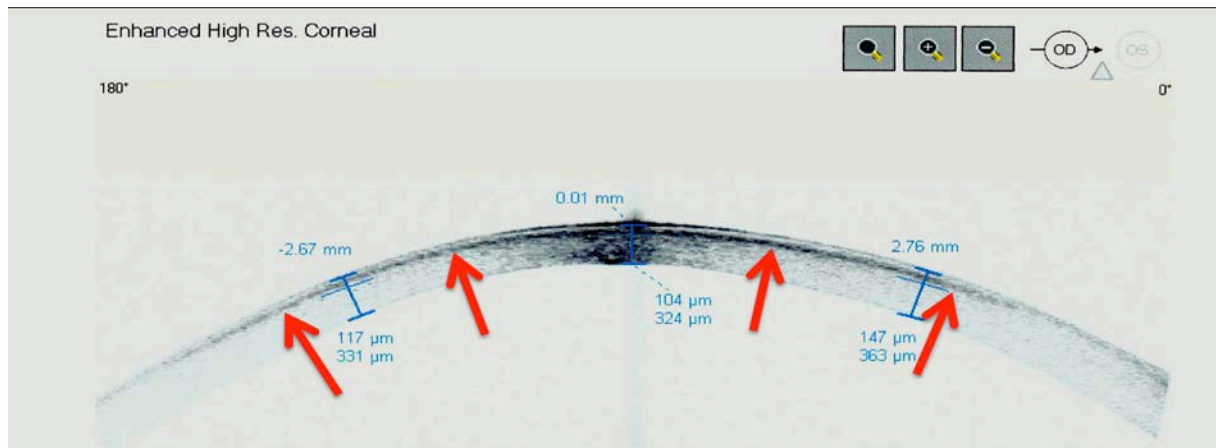


**Figure 28:** MET avec classification automatisée des calibres des fibrilles de collagène après CXL dans le stroma antérieur d'un patient normal (A-B), KC (B-C), KC après CXL (E-F). Code couleur pour le diamètre de section des fibres : Jaune > Bleu > Vert > Rouge. On note une augmentation de l'ordre des fibrilles et une augmentation du diamètre des fibrilles (apparition du bleu après CXL, initialement remplacé par le rouge retrouvé plus abondant dans les cornées KC versus patient normal). Akhatar et al, 2013.

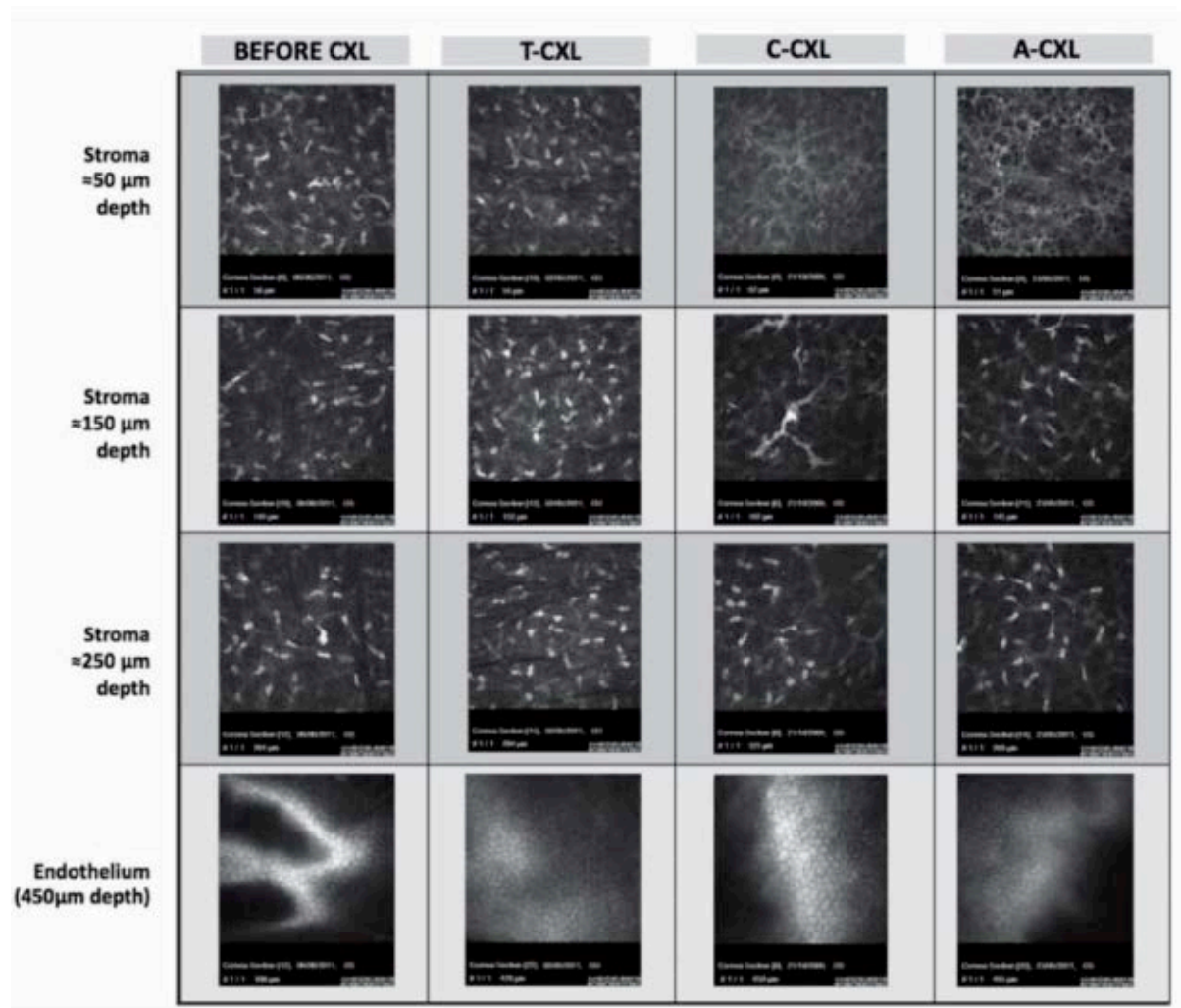
### e. OCT et Microscopie optique confocale

La visualisation de la déplétion kératocytaire en microscopie confocale *in vivo* et l'observation en OCT cornéen d'une ligne de démarcation pourraient être corrélés à la profondeur du traitement et à son intensité.<sup>36</sup> En revanche, l'intensité d'un « haze » superficiel observable en biomicroscopie est, semble-t-il, plutôt corrélée à la sévérité du KC au moment du CXL. Ainsi, il est probable que les formes plus avancées, à cornées trop fines, soient plus sujettes à la transformation des kératocytes activés en myofibroblastes.

Le CRNK du CHU de Bordeaux a pu mener une étude clinique, publiée en 2012, comparant différents modes de CXL, confirmant l'utilité du microscope confocal pour surveiller l'effet du CXL *in vivo*.<sup>35</sup> Cf. Figures 29 et 30.



**Figure 29:** Coupe OCT (*Optical coherence tomography*) à 1 mois post A-CXL montrant une ligne de démarcation franche entre le stroma antérieur et moyen (flèches). D Touboul et al. 2012.

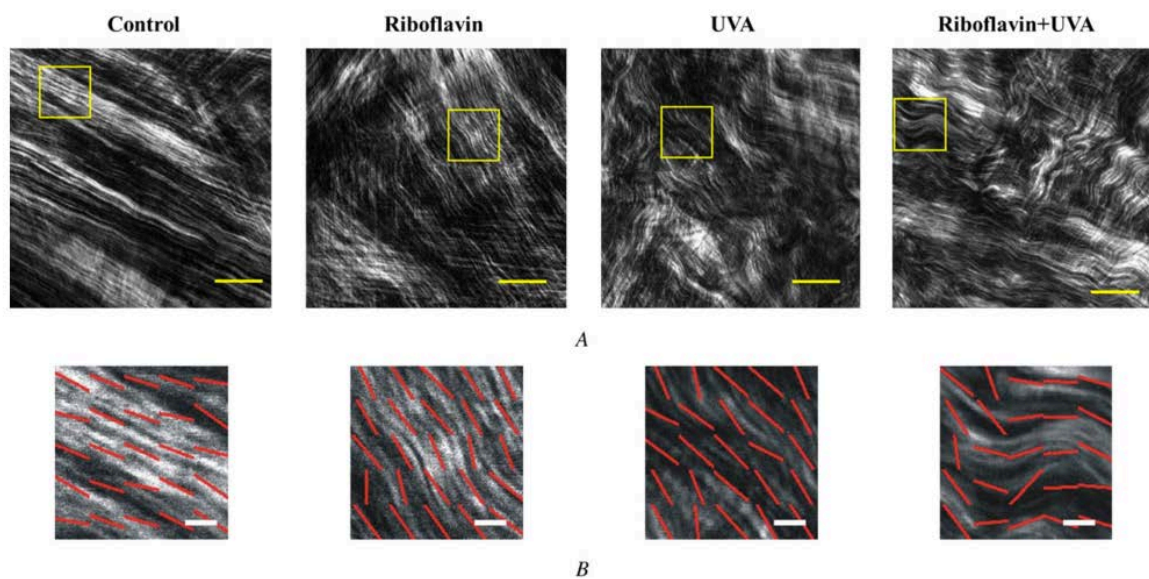


**Figure 30:** Microscopie confocale *in vivo*: Comparaison de trois protocoles de CXL : EPI OFF conventionnel C-CXL et Accéléré (A-CXL) et EPI ON Trans-épithélial (T-CXL). On note peu d'effet visible avec le T-CXL et une nette disparition des kératocytes dans le stroma antérieur et moyen pour le C-CXL et A-CXL, ce dernier étant toutefois plus confiné dans le stroma antérieur. La déplétion des kératocytes régressait fortement entre 3 et 6 mois post opératoire, la déplétion des plexus nerveux était plus durable. D Touboul et al. 2012.



## f. Microscopie multi-photonique

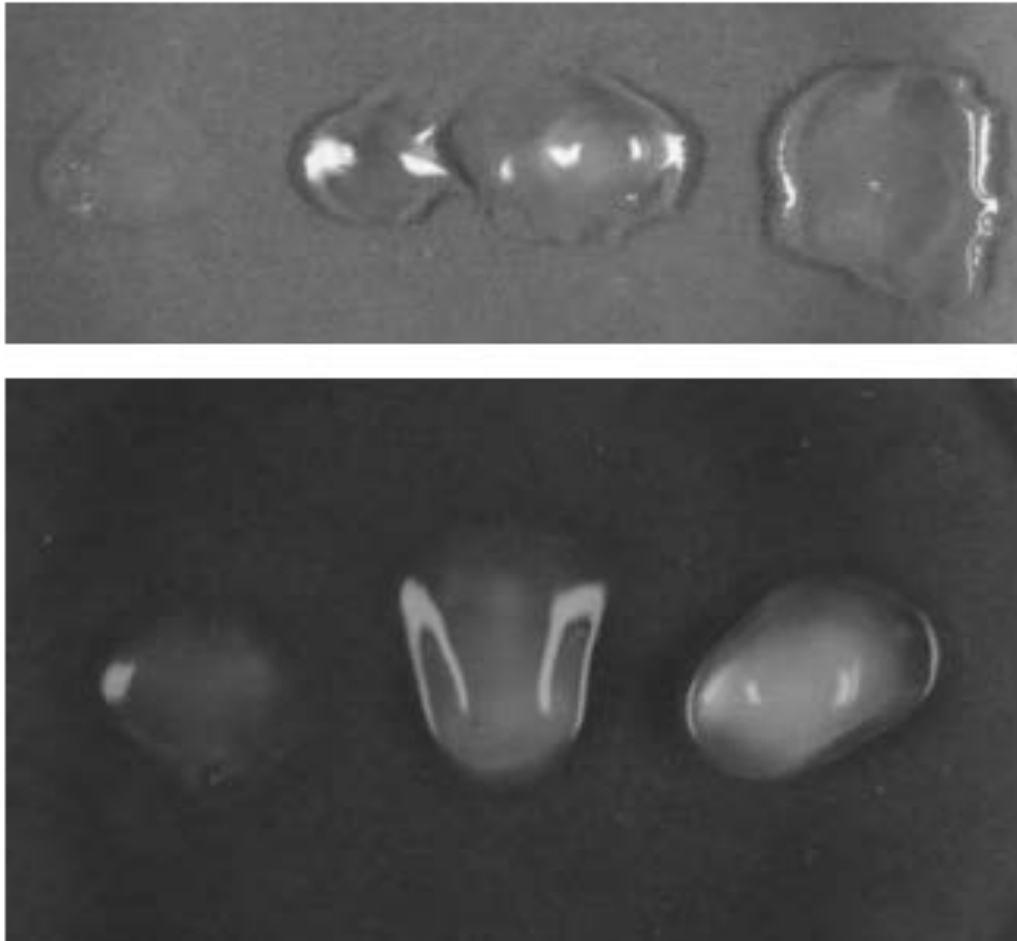
Vues en microscopie d'émission de seconde harmonique (imagerie à deux photons - SHG), les fibrilles de collagène sont nettement plus compactées après CXL qu'avant. Cette constatation est peut être en rapport avec l'apparition de nouvelles connexions entre le collagène et la matrice tissulaire.<sup>53</sup> L'étude de Tan et al (2013)<sup>54</sup> retrouve des constatations similaires. Cf. **Figure 31**.



**Figure 31:** Images SHG de cornées porcines, ex vivo, montrant un aspect plus ondulé des fibrilles après CXL. Echelles : barre A = 75 microns ; barre B = 7 microns. Tan et al, 2013.

### g. Test de digestion enzymatique

L'argument de la résistance du collagène à la lyse enzymatique, plus grande après CXL (pepsine, collagénase) est indirect, mais semble pertinent.<sup>55</sup> Cf. Figure 32.



**Figure 32:** Test de digestion enzymatique, cornées porcines (*ex vivo*), pour des procédures de CXL d'irradiation croissante de gauche à droite observé après 3 jours de digestion enzymatique avec une pepsine (en haut) ou une collagénase (en bas). Spoerl et al (2004).

## 2. Elastographie Cornéenne

### a- Introduction

L'élastographie est un domaine de recherche dont l'essor en radiologie remonte à la fin des années 80. L'objectif de l'élastométrie ou de l'élastographie cornéenne est d'accéder au module d'élasticité de la cornée aussi nommé module de Young (E). Pour ce faire, on observe un mouvement tissulaire associé à l'application d'une force à la surface ou au sein de la cornée. On a donc pour chaque portion de tissu examiné une première étape d'excitation pour obtenir une déformation et une seconde étape d'observation du mouvement généré. Cette phase d'excitation peut être intrinsèque ou extrinsèque.

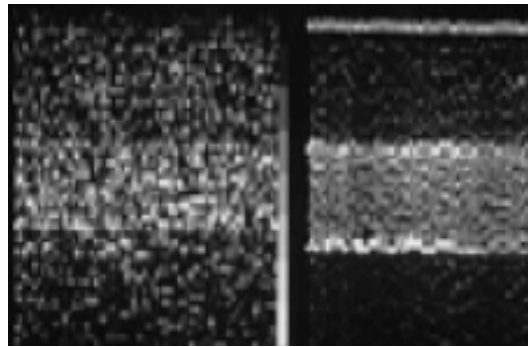
Il existe typiquement trois régimes d'excitation distincts :

- le régime statique (contrainte continue),
- le régime stationnaire (oscillations),
- le régime impulsionnel (impulsion brève).

Concernant l'étape d'observation, il existe deux approches différentes, transposable au cas de la cornée:

- l'approche quasi-statique,
- l'approche dynamique.

L'équipe de J. Ophir a contribué largement au développement de l'élastographie dite statique, s'intéressant aux milieux diffusants pour lesquels l'évolution temporelle du « *speckle* » échographique permettait de mesurer les déplacements. **Cf. Figure 32.** Ce *speckle* est défini comme le résultat de l'interférence des signaux rétrodiffusés par les inhomogénéités contenues dans le milieu. L'élastographie dite dynamique est devenue secondairement la spécialité de l'Institut Langevin-ESPCI, mondialement reconnu pour son expertise dans ce domaine.

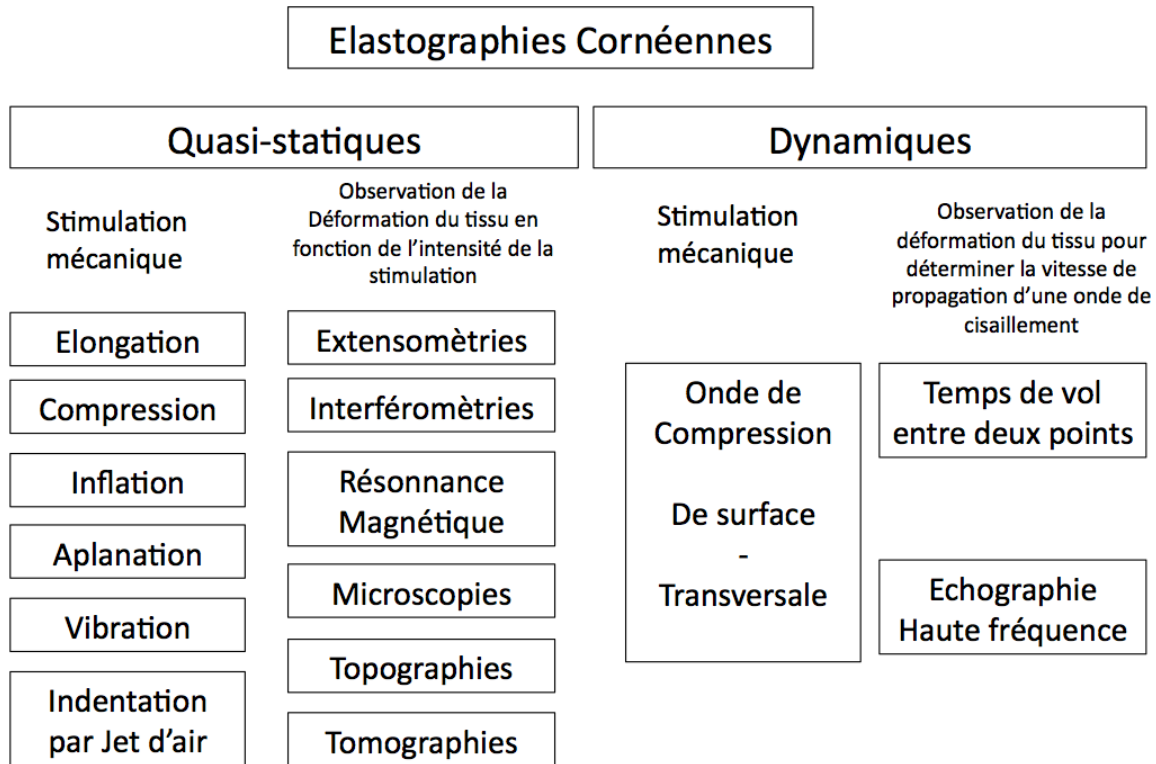


**Figure 32 :** Exemple d'étude de la variation du *speckle* échographique. J Ophir. ESPCI.

**Dans le cas de l'élastographie dite quasi-statique**, on applique une contrainte continue au milieu. Le déplacement généré est alors estimé entre la position de repos et la position sous contrainte. On peut ainsi en déduire la déformation et calculer le module de Young par l'intermédiaire de la loi de Hooke, la contrainte globale étant à peu près estimée. Dans la pratique, l'estimation du déplacement est réalisée par corrélation bidimensionnelle des images échographiques, ce qui donne une image de déformation. La cinétique de la contrainte étant inconnue, on représente le plus souvent uniquement la déformation dans l'image finale, c'est l'élastogramme. Cette technique a l'avantage d'être simple à mettre en place. En revanche, l'absence de connaissances des conditions aux limites (dont le rôle est très important dans la limite des stimulations basses fréquences), de la contrainte (même si des méthodes itératives permettent de l'estimer à partir de la surface) et de l'estimation de la déformation (qui nécessite une dérivation spatiale et est donc sujet au bruit) en fait une technique non quantitative.

**Pour le cas de l'élastographie dite dynamique**, le milieu doit avant tout être excité par une impulsion brève (élastographie impulsionnelle) ou avec une fréquence déterminée (élastographie stationnaire). On part ensuite de l'équation d'onde de cisaillement permettant de relier le champ de vitesse mesurée à la distribution du module de Young. Les techniques d'élastographie dynamique ont l'avantage de permettre une imagerie quantitative. Elles nécessitent cependant un matériel plus complexe permettant la génération des ondes de cisaillement (vibreux ou pression de radiation) et un dispositif de détection des ondes de cisaillement plus sensibles à des petites déformations (échographie ultrarapide ou séquences IRM d'encodage du mouvement).

L'ensemble des cycles de palpation stimulation/observation utilisés en élastographie donnent, selon les cas, une information utile sur de la dureté tissulaire locale ou moyenne, superficielle ou profonde, relative ou absolue. Les moyens de stimulations et d'observations pour la cornée sont variés et sont résumés dans le tableau suivant. **Cf. figure 33.**



**Figure 33 :** Classification des principales méthodes d'élastographies cornéennes selon les modalités de stimulation et d'observations possibles. Illustration D Touboul.

#### **b- Elastographie quasi-statique à forte amplitude de déformation : Extensométrie**

Le modèle physique de biomécanique de la cornée n'échappe pas aux modélisations habituellement utilisées pour caractériser les milieux biologiques ou tissus mous. Ainsi, la modélisation du comportement biomécanique de la cornée entre dans le cadre des lois de comportement des corps dits viscoélastiques où les notions d'élasticité et de viscosité définissent des propriétés comportementales de la matière sous l'effet d'une contrainte (force extérieure).

Le modèle de Kelvin-Voigt est souvent utilisé pour illustrer le comportement des corps viscoélastiques. Il met en série, comme dans un circuit électrique, une composante d'élasticité (module de Young :  $E$ ) et une composant de viscosité ( $\eta$ ). Ces dernières sont estimées expérimentalement lors d'un cycle de charge et de décharge définissant le profil d'élasticité du corps à tester, comme décrit dans le paragraphe suivant.

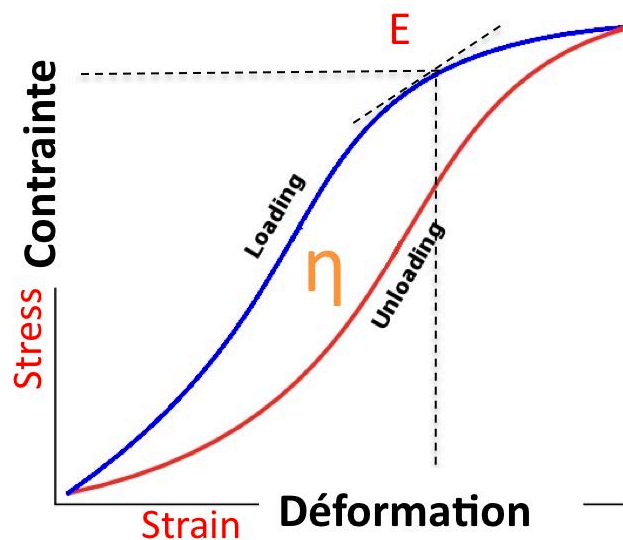
L'élasticité quantifie la résistance d'un corps à la déformation (rapport contrainte/déformation ou force de résistance par unité de surface en Pascal ( $\text{Pa} = \text{Newton (N)}/\text{m}^2$ ), c'est à dire la dureté de ce corps. Cependant, à chaque niveau de déformation correspond une dureté spécifique. La variation de cette dureté peut être plus ou moins linéaire en fonction du type de matériau et de sa capacité à garder son intégrité structurale sous la contrainte, c'est son profil d'élasticité. Comme pour toute construction physique, il existe un régime de déformation réversible, puis un régime de déformation irréversible (souvent dit plastique), précédant le point de rupture. Un corps purement élastique garde donc des propriétés dites élastiques dans les limites de sa déformabilité. Les valeurs connues d'élasticité de la cornée sont estimées par le module d'Young dans une amplitude de valeurs comprises entre 0.159 MPa et 57 MPa, selon les études.<sup>56</sup>

Dans son régime de déformation réversible, par définition, le délai de durcissement ou de ramollissement d'un corps purement élastique est nul (exemple du ressort), et sa vitesse de déformation constante. En revanche, lorsque celui-ci subit une latence lors de la mise en charge ou en décharge, ce dernier adopte un comportement dit viscoélastique où la viscosité ( $\text{Pa}\cdot\text{sec}$ ) est finalement la dérivée dans le temps de l'élasticité (exemple de l'amortisseur de voiture). En corollaire, l'énergie de déformation donnée à un matériau élastique est entièrement absorbée par celui-ci sans dissipation de chaleur. Dans le cas d'un corps viscoélastique, il existe une déperdition thermique (le corps chauffe) correspondant à l'hystérésis de ce corps, c'est à dire à sa capacité de transformation de l'énergie mécanique sous la forme de chaleur.<sup>57</sup>

Autrement dit, lorsqu'un corps contraint ne peut pas absorber toute l'énergie délivrée sous la forme d'une déformation il doit l'évacuer dans l'environnement sous forme de chaleur, assez rapidement pour ne pas perdre son intégrité (rompre ou fondre). Sa vitesse de déformation n'est donc plus constante mais décrit le plus souvent une courbe d'allure sigmoïde où le retour du corps à l'état de repos, une fois la contrainte levée, se fait à une vitesse différente de

celle constatée à sa mise en charge. La différence entre les deux trajets dépend du profil d'élasticité du corps testé.

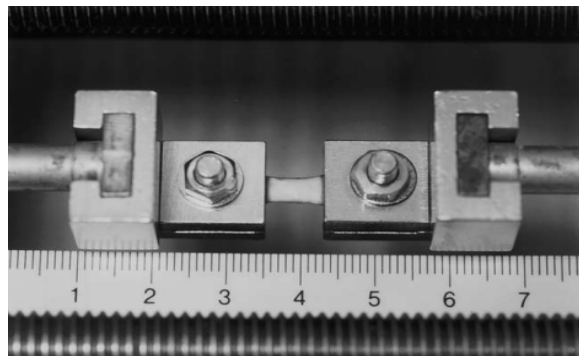
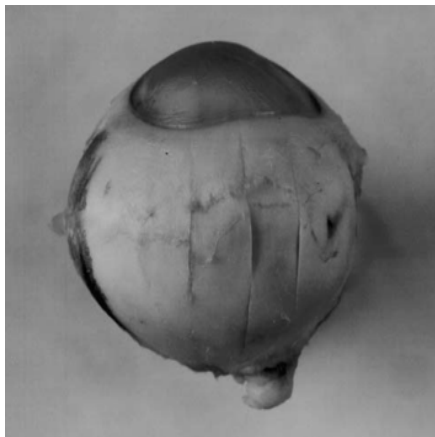
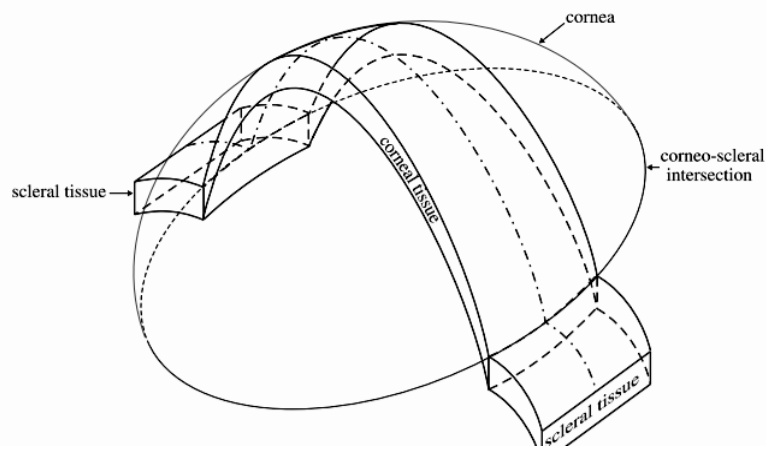
Plus précisément, le cycle de déformation sous la contrainte permet de tracer une courbe dont la pente, mesurée en tout point de la courbe, correspond à une valeur d'élasticité à un moment donnée de ce cycle. Le propre du mouvement de déformation d'un corps viscoélastique est de retrouver pour un même seuil de contrainte des valeurs d'élasticité différentes lors du chemin mise en charge et de mise en décharge du corps testé. La dureté du corps change ainsi en fonction du cycle de déformation du tissu, c'est sa signature viscoélastique. Le cycle ne décrit pas une droite mais un périmètre dont la surface est proportionnelle à l'hystérésis du corps concerné. De plus, l'amplitude de la contrainte et la vitesse de sa mise en œuvre influence ce profil viscoélastique alors que seule l'amplitude de la contrainte influencerait le trajet du profil d'un corps qui ne serait que purement élastique. La déformation spatiale d'un corps viscoélastiques est donc temporellement dépendante. **Cf. Figure 34.** L'exemple typique pouvant servir d'illustration est celui de la déformation d'un matelas en polymère viscoélastique : un coup de poing très puissant mais d'appuis très court déformera modestement le matelas localement, en revanche un coup de poing moins puissant mais d'appui plus prolongé inscrira une déformation plus ample.



**Figure 34 :** Représentation schématique de la courbe contrainte/déformation pour un corps viscoélastique. La période d'application de la force suit le trajet bleu, la période de relâchement suit le trajet rouge, l'aire entre les deux courbes ( $\eta$ ) représente la valeur de l'hystérésis. La pente de la courbe représente la variation du module de Young (E). Illustration D Touboul.

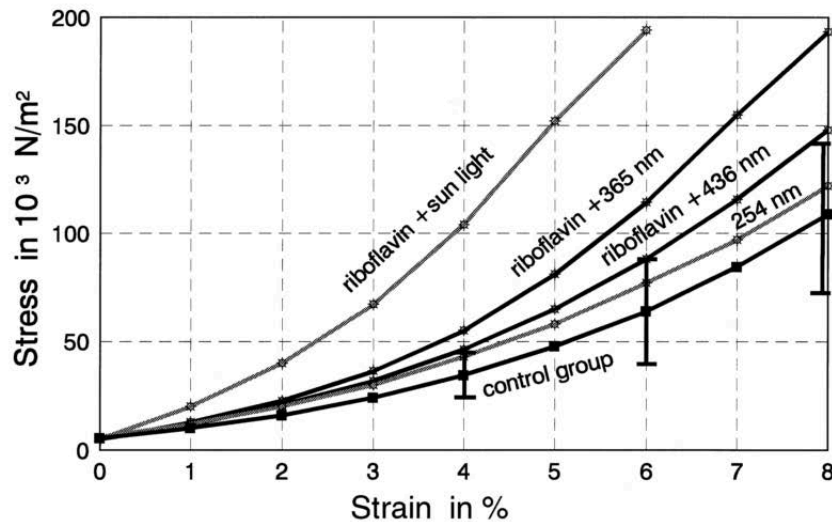
Ainsi, les tests d'analyse du ratio de déformation du tissu cornéen par extensométrie avant et après exposition au CXL sont à la base du développement de la technologie. Wollensak et Spoerl furent les premiers à mettre au point le protocole standardisé de découpe des lamelles de tissu pour mise en traction et cycles de contrainte/élongation. Les CXL furent pratiqués sur des cornées humaines, porcines ou de lapins, essentiellement *ex vivo*. Les résultats les plus représentatifs sont commentés dans les légendes des figures suivantes. **Cf. Figures 35 et 42.**

*Corneal strip extensometry tests* A. Elsheikh and K. Anderson

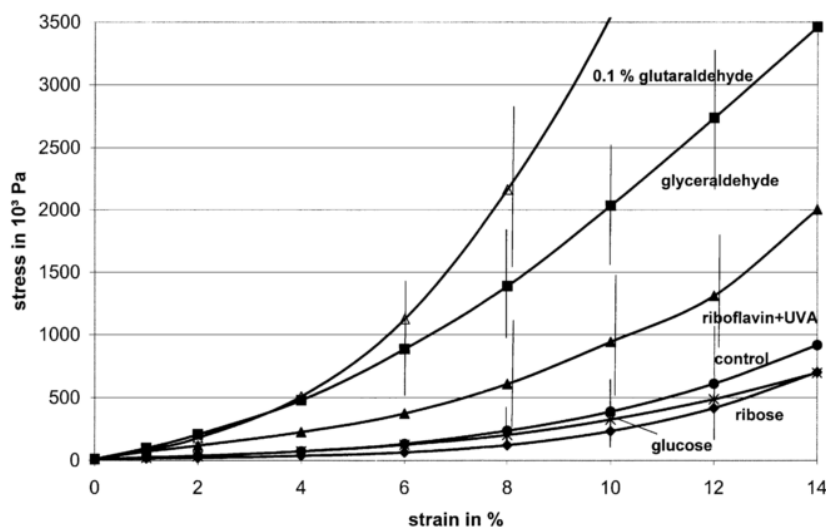


**Figure 35:** Méthodologie pour préparation des « *strips* » de lamelles cornéennes pour mesures élastométriques et réalisation des courbes contrainte/déformation. Wollensak et al, 2004. <sup>64</sup>

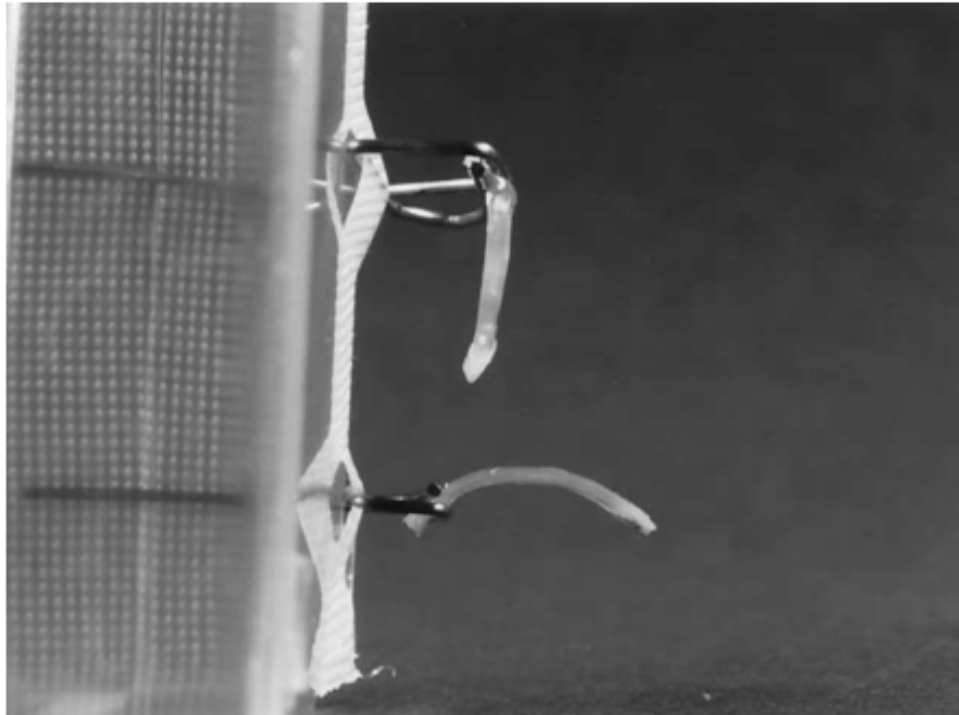




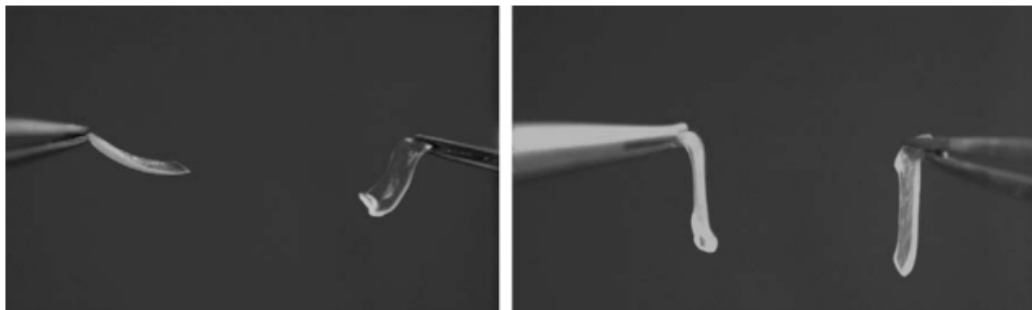
**Figure 36 :** Courbe élastométrique de contrainte/déformation pour la cornée porcine, soumise à différents traitements. La déformabilité est plus faible associant riboflavine et spectre solaire ou riboflavine et UV-A 365 nm. Les UV-A seuls n'ont pas d'efficacité par rapport au groupe témoin. Spoerl et al, 1998.<sup>58</sup>



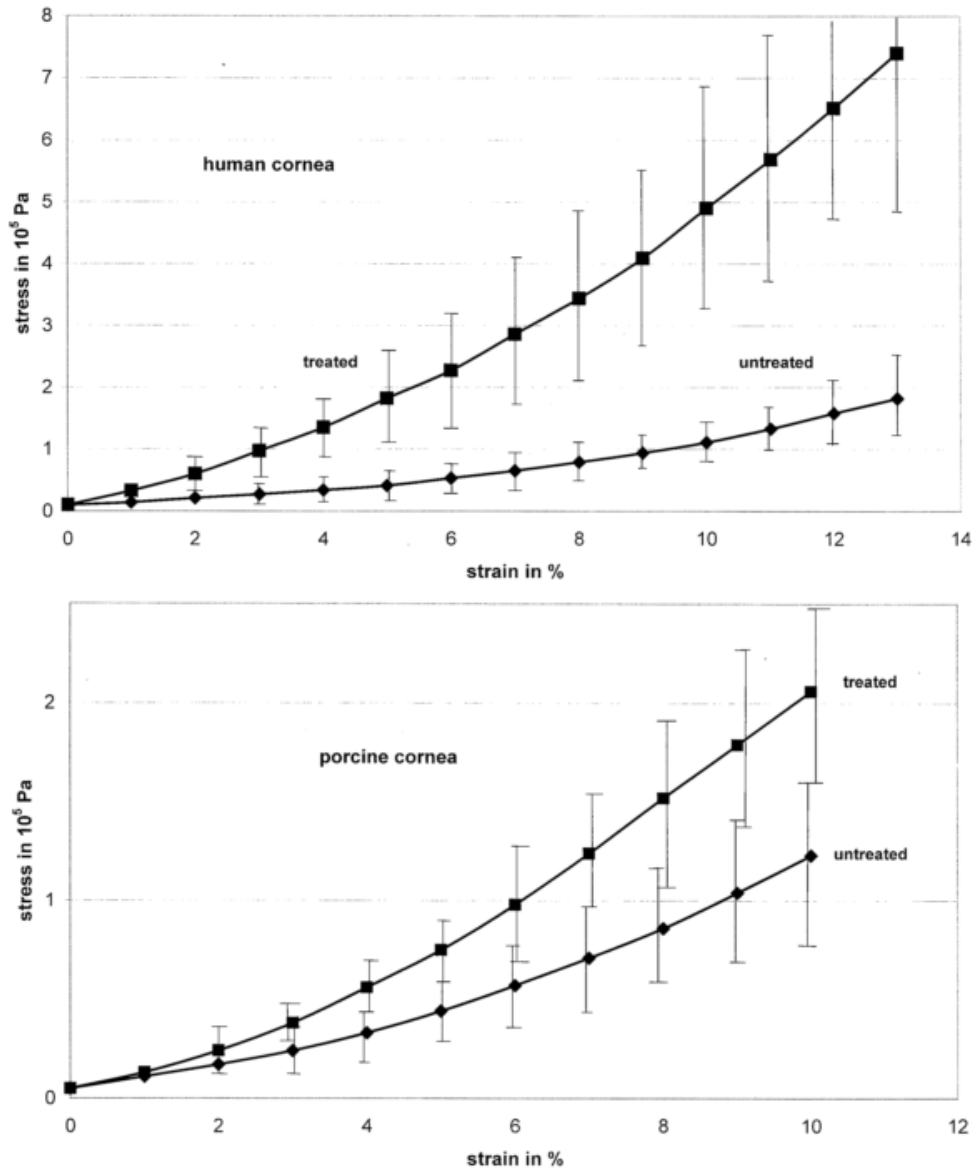
**Figure 37 :** Courbe élastométrique de contrainte/déformation pour la cornée porcine, soumise à différents traitements. Le glutaraldéhyde, fixateur histologique bien connu, a une efficacité plus forte pour durcir la cornée (porcine, ex vivo) que le couple riboflavine + UV-A, cependant intermédiaire avec le groupe témoin. Wollensak et al, 2004.<sup>48</sup>



**Figure 38 :** Illustration de la rigidification de *strips* de cornées porcines après CXL (image inférieure). Wollensak et al, 2004.<sup>48</sup>



**Figure 39:** Illustration de la rigidification de *strips* de cornées porcines après CXL (échantillons à gauche des images), comparant le stroma antérieur (image de gauche) et postérieur (image de droite) isolés par une découpe au microkératome mécanique. Seul le stroma antérieur est significativement durci par le CXL.<sup>59</sup> Kohlaas et al, 2006.



**Figure 40** : Comparaison extensométrique du modèle humain avec le modèle porcin (strips). Le CXL est proportionnellement plus efficace sur le tissu humain car la profondeur du CXL est liée à l'épaisseur de la cornée, plus fine chez l'homme. La cornée humaine non traitée semble par ailleurs nettement plus élastique que la cornée porcine, malgré une épaisseur moindre. Wollensak et al, 2004.<sup>60</sup>

Seule une étude publiée en langue anglaise par Wollensak et al (2009), incluse dans le précédent tableau, a pu évaluer par extensométrie l'efficacité du CXL réalisé *in vivo*, sur des cornées de lapins, dans un suivi prospectif.<sup>61</sup> Les résultats sont résumés ci-dessous :

**Table 1.** Measurements taken immediately after cross-linking (T<sub>1</sub>).

	Ultimate stress (MPa)	Young's modulus (MPa)	Ultimate strain (%)
Median of controls	3.3 (2.6–3.8)	11.1 (10.6–11.4)	52.3 (47.3–53)
Median directly after Cross-linking (range)	5.6 (5–5.7)	19.9 (19.6–20.2)	11.3 (10.3–11.6)
Percentage	69.7↑	79.3↑	78.4↓

**Table 2.** Measurements taken at 3 months after cross-linking (T<sub>2</sub>).

	Ultimate stress (MPa)	Young's modulus (MPa)	Ultimate strain (%)
Median of controls	3.3 (2.6–3.8)	11.1 (10.6–11.4)	52.3 (47.3–53)
Median 3 months after Cross-linking (range)	6.8 (6.6–7.9)	19.8 (19.6–20.7)	52 (51–60)
Percentage	106.0↑	78.4↑	0.57↓

**Table 3.** Measurements taken at 8 months after cross-linking (T<sub>3</sub>).

	Ultimate stress (MPa)	Young's modulus (MPa)	Ultimate strain (%)
Median of controls	3.3 (2.6–3.8)	11.1 (10.6–11.4)	52.3 (47.3–53)
Median 8 months after Cross-linking (range)	5.6 (5.4–6.2)	20.8 (19.9–21.4)	28.3 (28.1–30.2)
Percentage	69.7↑	87.4↑	45.9↓

**Figure 41:** Valeurs d'élasticité de la cornée retrouvées par extensométrie sur modèle lapin à J 1 (n =3), 3 mois (n =3) et 8 mois (n =3) post CXL. L'augmentation du module de Young fut constatée constante et estimée à environ 80%, par rapport à l'œil témoin, non traité. Wollensak et al, 2009.

Parameter	Ultimate Stress (MPa)	Young's Modulus (MPa)	Ultimate Strain (%)
Rabbit 1	5.4	21.3	50.5
Rabbit 2	6.8	18.6	53.3
Rabbit 3	5.3	19.3	49.3
Rabbit 4	5.6	20.4	48.8
Rabbit 5	6.1	19.7	51.2
Mean $\pm$ SD			
Treated eyes	5.84 $\pm$ 0.62	19.86 $\pm$ 1.04	50.62 $\pm$ 1.77
Control eyes	2.42 $\pm$ 0.5	9.81 $\pm$ 1.36	50.38 $\pm$ 2.71
Percentage increase	141.32	102.45	0.48
P value	.0001	.0001	NS
NS = not significant			

**Figure 42:** Valeurs absolues du durcissement obtenu par CXL, mesuré par extensométrie sur cornée de lapins (multiplication par un facteur 2). Wollensak et al, 2009.<sup>62</sup>

**L'extensométrie cornéenne a ainsi permis de lancer la technologie mais souffre de nombreux biais méthodologiques :**

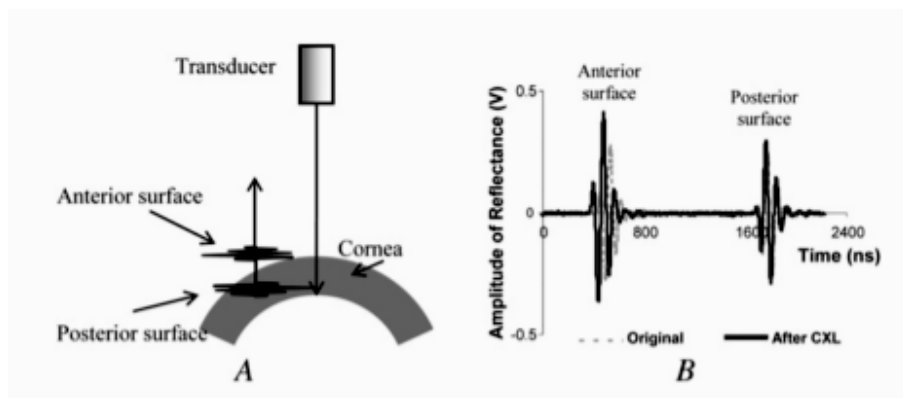
- Réalisation du CXL *ex vivo* le plus souvent,
- Perte des conditions aux limites du tissu par la découpe des *strips*,
- Quasi absence de suivi dans le temps des effets du CXL,
- Utilisations d'espèces variables, dont l'épaisseur est elle aussi variable et est importante pour déterminer le ratio de tissu affecté par le CXL ainsi que pour l'efficacité de la mise en traction des tissus.

### c - Elastographie quasi-statique à faible amplitude de déformation

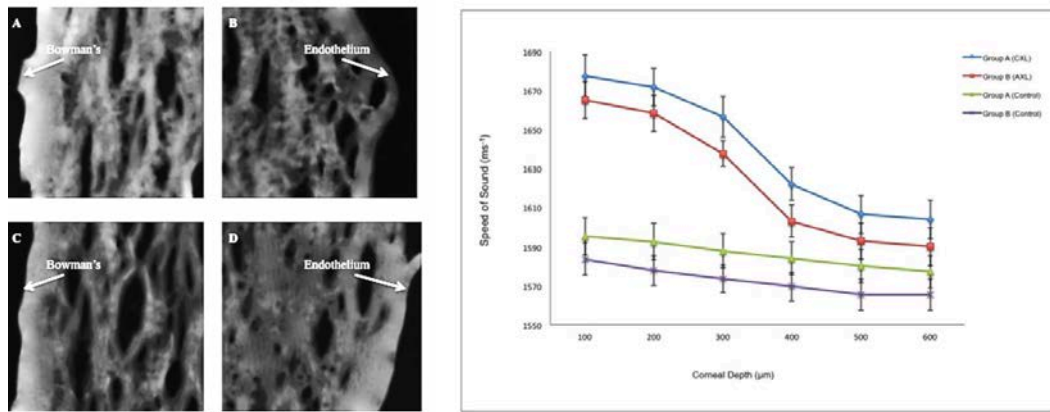
Des méthodes plus subtiles que l'extensométrie ont été mises en œuvre par différents auteurs. L'inflation du globe oculaire entier a comme avantage de maintenir la cornée dans des conditions aux limites réalistes. La pression est augmentée progressivement et le ratio de déformation de la surface oculaire permet de calculer une variation d'élasticité relative.

#### i. Microscopie acoustique

Le SAM (pour *scanning acoustic microscopy*) permet de mesurer en coupe la variation de vitesse acoustique dans de la cornée, proportionnellement au module de compression. Il a pu être mis en évidence par He et al.<sup>63</sup> puis par Beshtawi et al.<sup>64</sup> Cf. Figures 43 et 44. Une nette différence de profil vitesses de propagation du son dans la cornée après CXL. Il n'est pas certain que cette méthode mesure directement le durcissement du collagène mais serait plutôt le reflet du taux d'hydratation, modifié par le CXL.



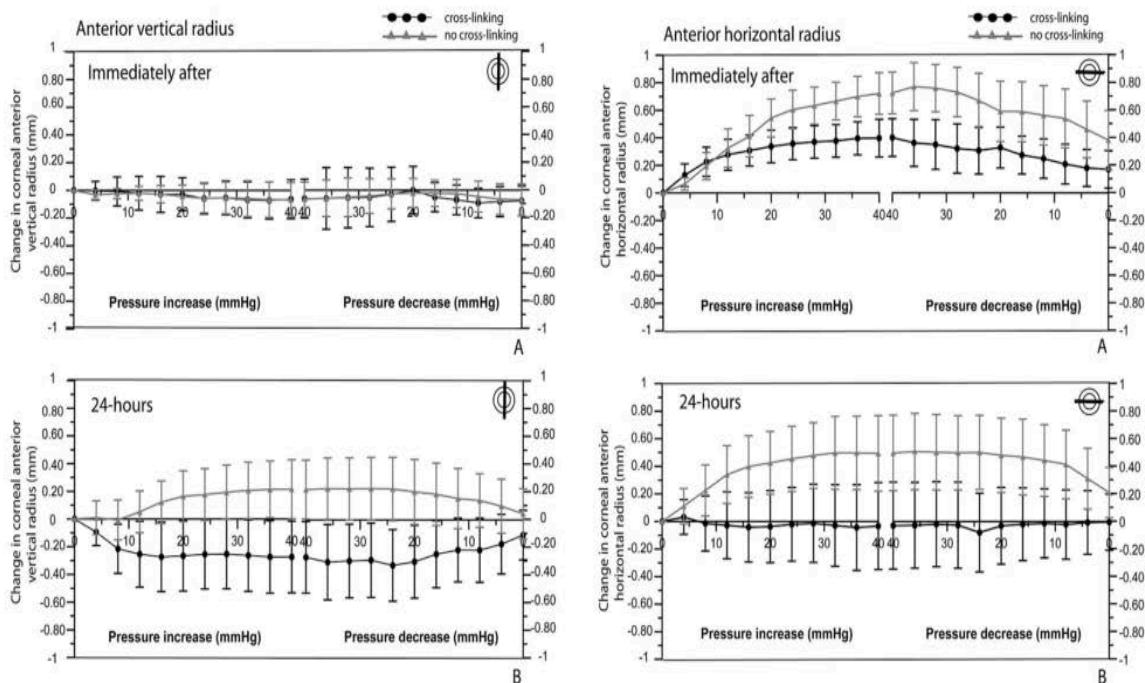
**Figure 43 :** Le délai acoustique entre les échos des faces avant et arrière d'une cornée porcine (*ex vivo*) permet de donner une estimation relative du durcissement de celle-ci. He et ont mis au point un système mesurant la réflectance des ultrasons, celle-ci étant perturbée après CXL. He et al, 2010.



**Figure 44 :** A gauche, images de cornées humaines (*ex vivo*) traitées (en haut) ou non (en bas) par CXL, obtenues en microscopie acoustique SAM. A droite, accélération de la vitesse des ondes de compression dans le stroma antérieur après C-CXL ou A-CXL. Beshtawi et al, 2013.

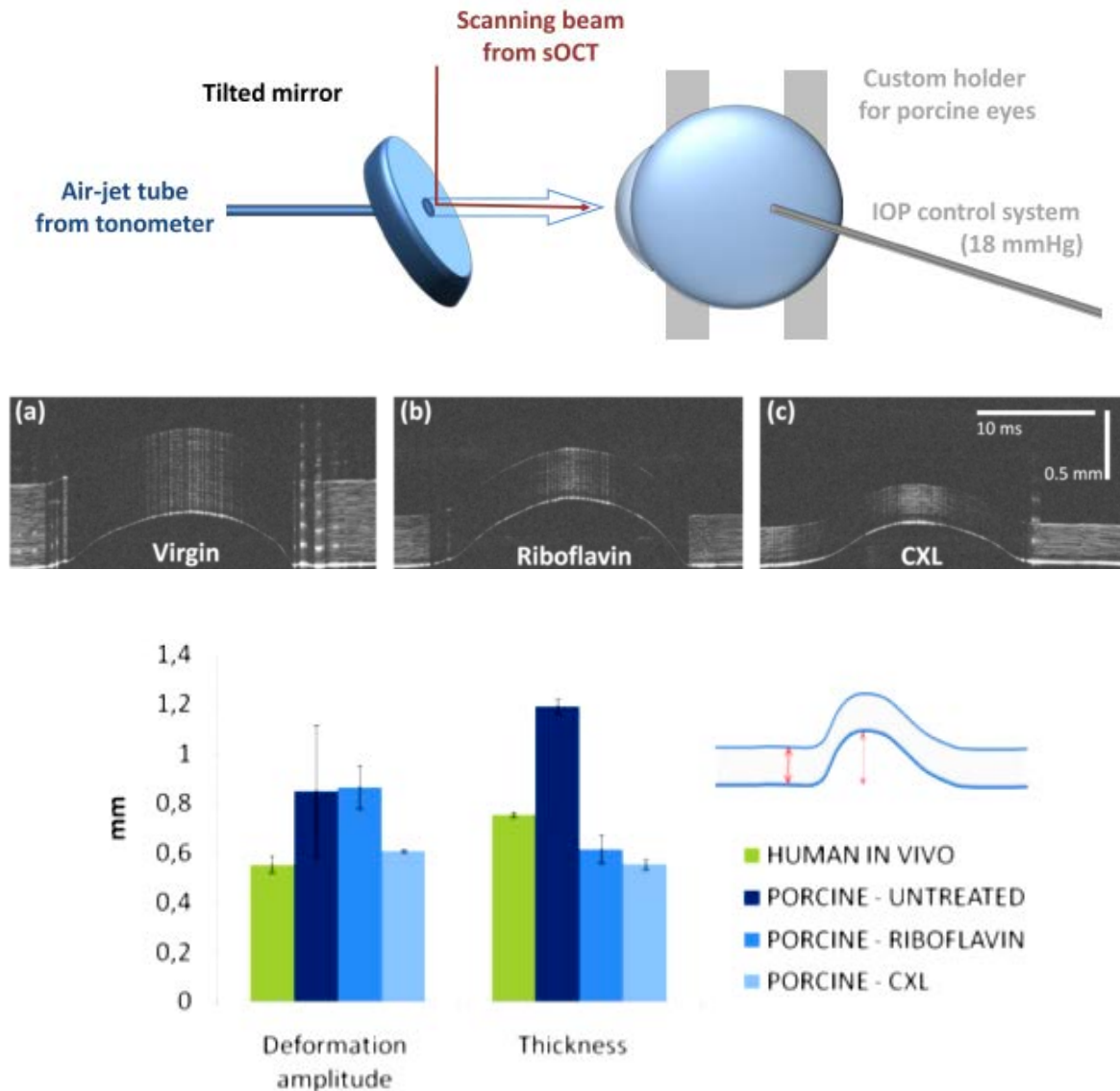
## ii. L'imagerie par tomographie à cohérence optique (OCT)

Elle permet une bonne résolution pour réaliser des mesures élastographiques à grand champ. Kling et al ont pu valider la diminution de la déformabilité de la surface cornéenne après CXL.<sup>65</sup> Cf. Figure 45.



**Figure 45:** Amplitudes des modifications de courbure antérieure de la cornée vues en OCT quasi-statique. Après CXL, la cornée est moins déformable (globes porcins, *ex vivo*). Kling et al, 2010.

Couplé à un système de jet d'air pulsé, l'OCT devient « dynamique » et permet une élastographie quasi-statique par indentation (OCT haute fréquence).<sup>66</sup> Le concept est proche de celui du Corvis ST qui n'a pas fait l'objet de publication sur le CXL à ce jour. Cf. **Figure 46**.

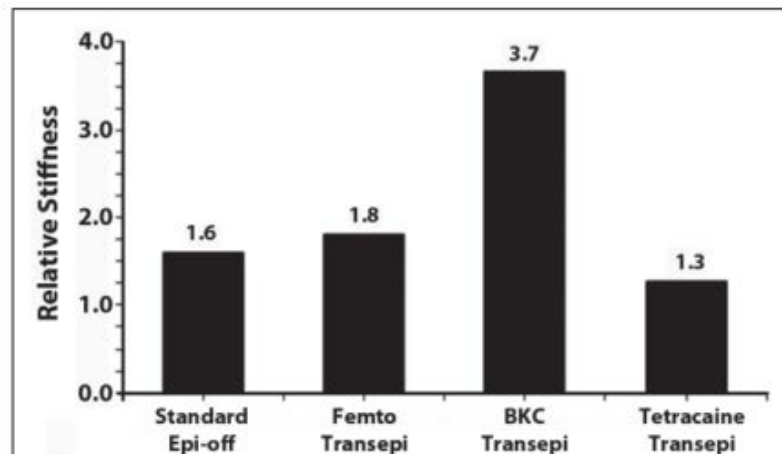


**Figure 46:** Amplitudes des modifications de courbure antérieure de la cornée porcine (*ex vivo*) vues en élastographie OCT dynamique (jet d'air calibré de 20 ms). Après CXL, la cornée est moins déformable (globes porcins). La cornée humaine est bien moins déformable que la cornée porcine malgré une plus faible épaisseur moyenne. Cette technologie est transposable *in vivo*. Dorronsoro et al, 2012.



L'élastographie OCT développée par Ford et al <sup>67</sup> fut aussi utilisée par Armstrong et al sur modèle lapin, après différents modes de CXL réalisés *in vivo* avec un suivi de deux mois. <sup>68</sup>

Cf. Figure 47.



**Figure 47** : Mesure du durcissement moyen par élastographie OCT de cornées de lapins, *in vivo*, deux mois post CXL. Après CXL, la cornée durcie paradoxalement plus après procédure trans-épithéliale (Benzalkonium : BKC). Armstrong et al, 2013.

#### d - Elastographie dynamique par analyse de la propagation d'ondes mécaniques

Il est certain que, le plus souvent, l'observation d'un objet induit un changement relatif de son état et donc un biais d'examen inévitable. Pour bien faire, le scientifique choisit les procédés d'observation qu'il juge les moins compromettants pour la caractéristique qu'il cherche à observer sur son sujet. Il en est de même pour la biomécanique cornéenne dont l'outil princeps est un stimulus mécanique qui implique une modification de l'état basal de l'objet. Le mieux est donc de respecter au mieux l'intégrité morphologique du sujet et de mesurer des indices de dureté en limitant les variations morphologiques pendant l'examen. Le principe de la mesure de la vitesse de propagation des ondes mécaniques qui est développé dans ce manuscrit semble être une des solutions des plus pertinentes.

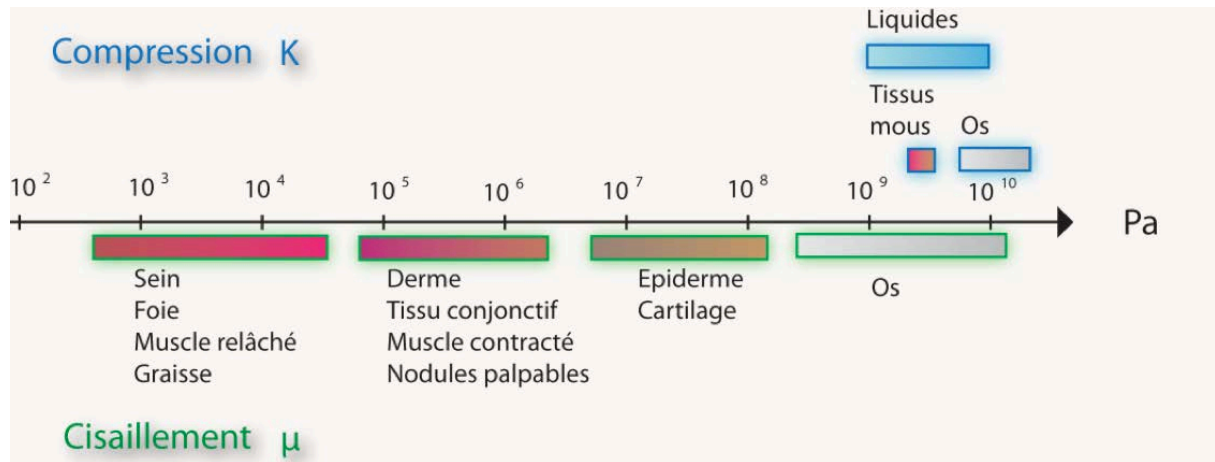
L'expression mathématique de l'élasticité est résumée par la loi d'Hooke (1678). L'élasticité ou module d'Young (E) est défini comme le rapport de la contrainte sur la déformation. Il s'exprime aussi en fonction du module de compression (K : Bulk) et du module de cisaillement ( $\mu$ ) selon l'approximation suivante appliquée aux tissus mous :

$$E = \frac{\sigma \text{ (Contrainte)}}{\epsilon \text{ (Déformation)}} = \mu \frac{3K + 2\mu}{K + \mu}$$

Les tissus biologiques peuvent être considérés comme quasi- incompressibles car le module de compression K (GigaPa) est très supérieur au module de cisaillement  $\mu$  ( $10^2$  à  $10^7$  Pa). Le module de cisaillement  $\mu$ , qui quantifie la dureté des tissus, peut varier de plus d'un ordre de grandeur d'un tissu à l'autre (graisse, tissu conjonctif, glande, muscle, etc). N'oublions pas que l'on parle de quasi incompressibilité et non pas d'incompressibilité car, sans compressibilité, il ne pourrait y avoir propagation d'ultrasons dans le milieu. De plus, en l'absence de dispersion importante, la vitesse des ondes de cisaillement est directement liée à  $\mu$ . Ainsi :

Si  $K \gg \mu$  ; alors E est presque égal à  $3\mu$  avec la relation :  $\mu = \rho v^2$  ( $\rho$ = densité de l'eau). Ainsi, en mesurant la vitesse de l'onde de cisaillement v, on remonte simplement à la valeur de E.

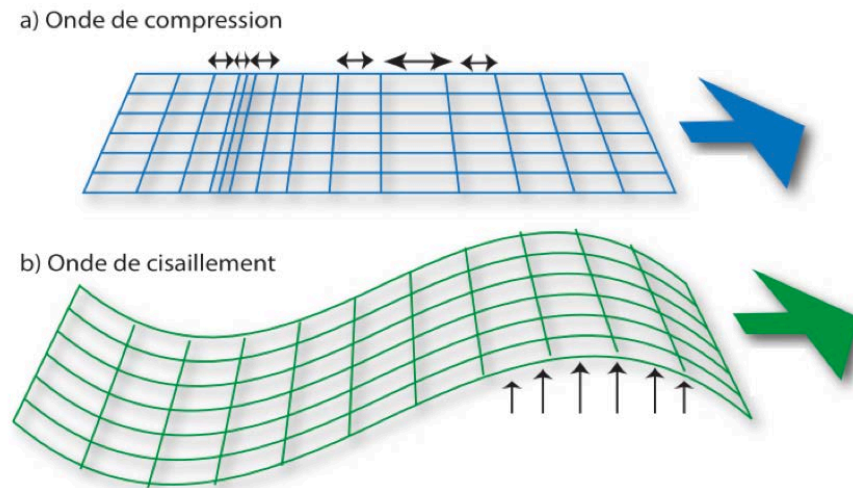
La **figure 48** montre le spectre de différenciation des tissus biologiques en fonction des modules de compression et de cisaillement :



**Figure 48 :** Ordres de grandeur et fenêtres de variations des modules d'élasticité dans le corps humain (Sarvazyan et al). Le module d'élasticité de la cornée, très proche de son module de cisaillement, se situe habituellement entre 0,1 et 10 MPa. Source Thèse T Deffieux.

#### i- Principe de l'utilisation des ondes mécaniques pour faire de l'élastographie dynamique

Il existe deux types d'ondes mécaniques pouvant se propager dans les tissus biologiques. Ces ondes mécaniques répondent à une stimulation oscillatoire générée à distance ou dans le milieu de propagation. Leur propagation résulte des propriétés biomécaniques des tissus traversés et en particulier de leur cohésion et architecture interne. Ces deux types d'ondes sont classés en fonction de la direction préférentielle de la déformation qu'ils imposent au tissu. Ainsi, les ondes de compression induisent un déplacement dans l'axe de propagation de l'onde alors que les ondes de cisaillement induisent un déplacement perpendiculairement à l'axe de propagation de l'onde. Cf. **Figure 49**.



**Figure 49:** Illustration des ondes mécaniques de compression (a) et de cisaillement (b).  
Source Thèse T. Deffieux.

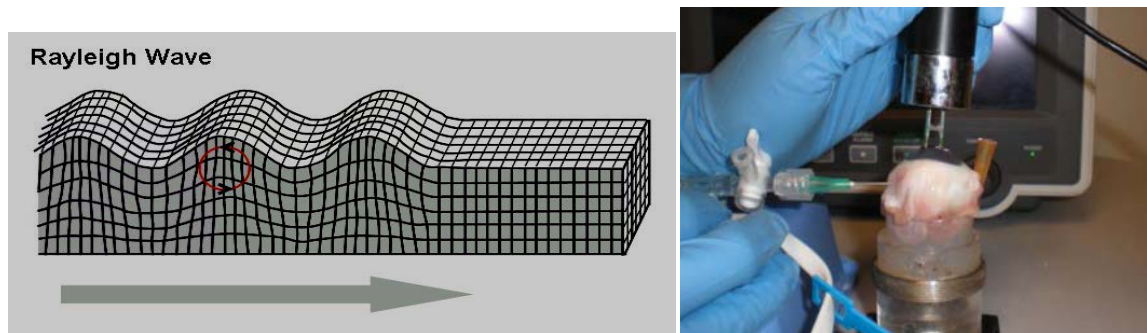
Chacune de ses ondes peut être utilisée afin de sonder la matière. Le principe même du sonar puis de l'échographie repose sur la génération d'ondes de compression par une source de vibrations ultrasonique. Celle-ci permettant de recevoir les échos obtenus au niveau des interfaces dont l'impédance acoustique est variable. Cependant, la mesure du temps de vol de ces échos permet avant tout de tracer une cartographie morphologique des milieux traversés. Ces ondes de compression se propageant particulièrement bien dans l'eau, principal constituant des tissus biologiques, elles sont particulièrement adaptées à l'imagerie tissulaire mais ne donnent pas directement de renseignements sur le comportement biomécanique du tissu. Pour en obtenir il faudrait surtout pouvoir mesurer les fines variations de vitesse des ondes mécaniques se propageant entre deux interfaces échogènes. Les différences intra-tissulaires de comportement au passage de l'onde sont en effet peu exploitables du fait de la très faible compressibilité de l'eau contenue dans les tissus. L'échographie traditionnelle, qui se base sur l'émission d'ondes mécaniques haute fréquence (1 à 50 MHz), n'est donc sensible qu'aux changements de module de compression des tissus.

En revanche, la génération d'ondes mécaniques de beaucoup plus basses fréquences dans le corps (10 à 500 Hz) induit du cisaillement dans les milieux avec une sensibilité assez pertinente pour différencier les différentes zones de dureté d'un organisme biologique. Par ailleurs, l'atténuation de ces ondes, qui est fonction de la viscosité du milieu et de leur guidage géométrique au sein du tissu (réflexions et effets de bords), donne des informations complémentaires sur les propriétés biomécaniques du tissu.

## ii- Elastométrie dynamique cornéenne par ondes de surface

### • Principe

La génération d'ondes de cisaillement de surface (onde de Rayleigh) est possible sur la cornée en appliquant à son contact une sonde à ultrasons piézoélectrique (technologie SWE : *surface wave elastometry*). La vibration localisée générée par une brève poussée ultrasonore entraîne la propagation concentrique et centrifuge d'une onde sismique de surface qui se déplace avec une vitesse proportionnelle au module de cisaillement et donc à l'élasticité moyenne entre le point de stimulation et le point de récupération du signal. Compte tenu de l'atténuation de l'onde, l'électrode de récupération du signal ne doit pas être trop éloignée (1 à 3 mm). Le temps de vol mesuré peut être utilisé pour cartographier la surface oculaire de manière séquentielle. C'est le travail réalisé par Dupps et al <sup>69</sup> sur des cornées porcines à l'aide du prototype fabriqué par Sonic Eye (PriaVision Inc ®). Cf. **Figure 50**. Secondairement, le durcissement de la cornée grâce au CXL accéléré (flash) a pu ainsi être mis en évidence par Rocha et al <sup>70</sup> (18.3 m/s avant CXL versus 25.5 m/s après CXL) sur modèle porcin *ex vivo*.



**Figure 50 :** Illustration des ondes de cisaillement de surface (sismique) à gauche. Dispositif expérimental avec illustration de la sonde Sonic eye (Priavision®) à droite. Rocha et al, 2008.

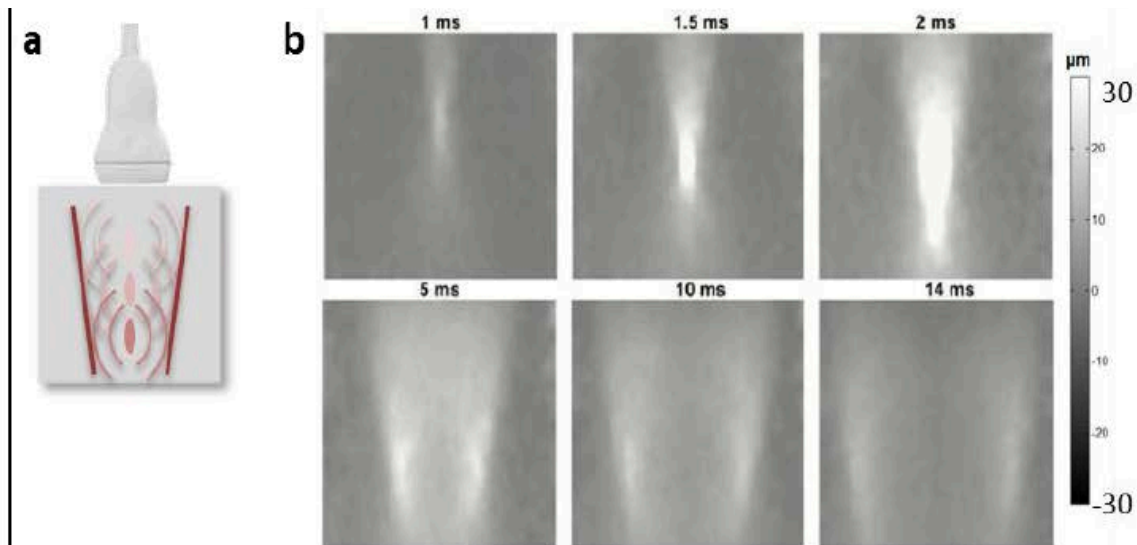
### • Avantages et limitations

La technologie est intéressante car permet une mesure simple de la biomécanique via les propriétés de propagation des ondes de cisaillement superficielles. En clinique, la technologie est appropriée pour la détection de mécanismes isotropes affectant la tension de surface véritablement homogène. La mesure est réalisée en mode contact et ne permet pas d'imagerie associée, les conditions de mesures sont dépendantes de la compression exercée sur le tissu. Il est difficile de suivre l'évolution d'une zone de la cornée dans le temps, la dureté de surface n'est sans doute pas le témoin de la dureté globale de la cornée. Cette technologie n'a pas fait l'objet d'étude clinique à ce jour.

### iii- Elastographie cornéenne dynamique par ondes de cisaillement

- Principe

Le principe de l'élastographie dynamique par onde de cisaillement ou *shear wave* (SW) est d'imposer une compression localisée et de très faible amplitude de déplacement (environ 10 microns) au sein de la cornée, puis de mesurer la vitesse de déplacement de l'onde de cisaillement ainsi générée avec une sonde d'échographie suffisamment rapide pour voir passer la déformation. La mise en forme de l'onde de compression est déterminante afin de générer efficacement une onde de cisaillement transversale. La technologie *Shear wave Supersonic Imaging* (SSI) repose sur une poussée ultrasonore séquentielle évoluant de la surface à la profondeur du tissu en plusieurs impulsions successives distribuées plus rapidement que la vitesse de propagation de l'onde générée. Cette construction de la poussée induit l'équivalent d'un cône de Mach (à l'origine du terme *Supersonic*) et permet d'obtenir une onde de cisaillement quasi-plane. Cf. **Figure 51**. Les deux étapes d'excitation et d'acquisition sont effectuées par une même sonde échographique pilotée électroniquement.



**Figure 51 :** (a) Le point focal est déplacé à une vitesse supersonique par rapport à la vitesse de déplacement de l'onde de cisaillement afin de créer une onde plane par interférences constructives. (b) Exemple du déplacement axial induit dans un gel d'agar. Source J Bercoff et al, 2004.

La partie d'analyse de la vitesse de l'onde qui permet une estimation de la dureté en 2D du tissu, repose sur une imagerie de déplacement très haute fréquence (10 à 20 MHz), environ 1000 fois plus rapide que les systèmes échographiques habituels (50 images seconde). A cette fréquence la propagation de l'onde, qui est typiquement de quelques mètres par seconde, est visible et permet de reconstituer une cartographie par moyennage d'une séquence d'impulsions. Pour une barrette échographique longue de quelques centimètres, le temps de passage de l'onde est de quelques millisecondes. La méthode est souvent qualifiée de transitoire car le délai entre la stimulation et la mesure de vitesse est très court ; ce qui par ailleurs permet d'éviter le bruit de fond lié aux rebonds des ondes aux berges du tissu (conditions aux limites). Le traitement des données permet d'extraire la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement en chaque point du plan d'imagerie. Enfin la conversion de l'image de cisaillement en cartographie d'élasticité fait intervenir une stratégie complexe de traitement du signal qui sera expliquée au **Chapitre 2**.

- **Avantages et limitations**

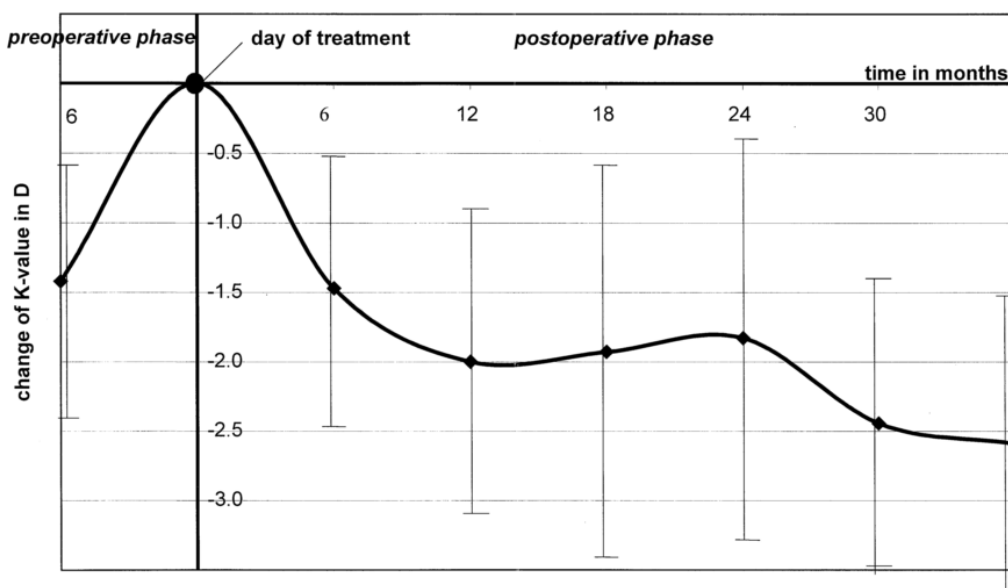
Les valeurs de dureté mesurées sont le reflet des véritables propriétés viscoélastiques de la cornée. Le tissu n'est pas macroscopiquement déformé. L'imagerie est transitoire et permet de négliger l'importance des conditions aux limites. L'onde est guidée, ce qui limite la dispersion et l'importance de la viscosité. Enfin, la technologie est transposable *in vivo* car elle est non destructrice.

Comme tout échographe, le couplage est au mieux assuré en immersion ou avec un gel échographique en prenant soin de purger toute les bulles d'air. Dans ces conditions, le taux d'hydratation de la cornée peut varier et perturber les propriétés biomécaniques. Le couplage impose des conditions d'examen parfois difficiles à obtenir sur l'animal, nécessitant la réalisation d'un bain d'immersion et la mise en traction des paupières. Chez l'homme, la faisabilité d'un dispositif d'interface est étudiée dans le **Chapitre 4**. Les conditions de mise en tension et les déplacements de la cornée ont une importance sur les mesures (PIO, paupières, mouvements oculaires, etc).

La résolution spatiale de l'élastographie cornéenne par SSI est néanmoins dépendante de la fréquence de la sonde qui pour l'instant ne dépasse pas 20 MHz, ce qui correspond à une résolution axiale de 70 microns.

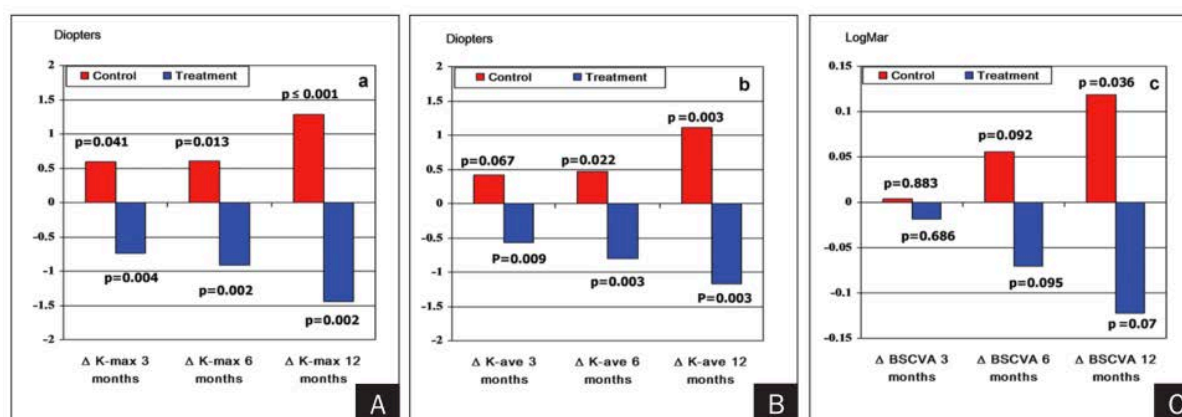
### 3. Essais cliniques : les preuves d'efficacité sur la maladie Kératocône

L'essentiel des arguments pour définir l'efficacité du CXL pour l'arrêt de la maladie KC repose sur plusieurs études de cohortes. Ces études sont relativement faibles d'un point de vue méthodologique mais concourent toutes vers les mêmes tendances : le C-CXL inhibe la progression des KC évolutifs à au moins 12 ou 25 mois de suivi pour plus de 80% des patients.<sup>71</sup> La cohorte historique de Dresden fut publiée par Wollensak et al en 2003.<sup>72</sup> **Cf. Figure 52.** La revue de la littérature de Suri et al reprend l'essentiel des données cliniques sur l'amélioration kératométriques.<sup>73</sup> L'étude Australienne initiée par Wittig et al est la seule étude comparative avec réelle randomisation des patients, avec à présent un suivi moyen de 3 ans.<sup>74-76</sup> **Cf. Figure 53.** L'étude du CRNK démontre aussi une bonne efficacité kératométrique des procédures à 12 mois.<sup>77</sup> **Cf. Figure 54.**



**Figure 52** : Suivi longitudinal (30 mois) de la kératométrie moyenne de la cohorte historique de CXL de Dresden. Wollensak et al, 2003.





**Figure 53:** Résultats à 3,6 et 12 mois (de gauche à droite) pour : Kmax, Kmoyen, Acuité visuelle) de la cohorte Australienne, seule étude randomisée sur le CXL. Wittig et al, 2007. L'étude à 3 ans, qui sera bientôt publiée, retrouve les mêmes tendances.

Parameter	Number of Eyes (%)		
	Regression	Stability	Progression
<b>Kmax reading</b>			
6 mo (n = 104)	37 (35.5%)	51 (49.03%)	16 (15.3%)
12 mo (n = 61)	13 (21.1%)	42 (68.8%)	6 (9.8%)
<b>CDVA</b>			
6 mo (n = 110)	36 (32.7%)	53 (48.1%)	18 (16.3%)
12 mo (n = 65)	26 (40.0%)	31 (47.6%)	8 (12.0%)

CDVA = corrected distance visual acuity; K = keratometry

**Figure 54 :** Pourcentages de patients évolutifs, stables ou régressifs à 6 et 12 mois observés dans la cohorte Française (CRNK). Asri et al, 2011.

Globalement, le CXL induit une diminution de la kératométrie centrale d'environ 1 à 2 D avec parfois une amélioration de la meilleure acuité visuelle. Néanmoins, il existerait un échappement de l'effet pour les enfants quelques années après la procédure et les cornées trop fines (< 330 microns) ne seraient plus efficacement stabilisées par le CXL (solution hypo-osmolaire).<sup>78-79</sup>

## VI - CONCLUSIONS DU CHAPITRE 1

Ce premier chapitre explique la réalité du CXL et l'importance de ces nuances, il le positionne comme un élément capital dans le spectre des indications thérapeutiques de la prise en charge du Kératocône. Il justifie l'intérêt des chercheurs pour une approche trans-épithéliale et accélérée des protocoles, il introduit en particulier la iontophorèse comme une innovation très pertinente compte tenu des attentes des cliniciens. Il tente une lecture objective des preuves scientifiques du fonctionnement et de l'efficacité biomécanique de la procédure de CXL.

Les preuves indirectes de durcissement de la cornée et l'effet clinique du CXL ne sont plus sujettes à caution. En revanche, la plupart des constatations biomécaniques obtenues après CXL sont extrapolées de modèles animaux, issues le plus souvent d'essais réalisées *ex vivo*, en dehors des conditions aux limites de la cornée, sans évaluation de l'effet dans le temps. Cette constatation renforce l'intérêt de développer des approches de mesures de la biomécanique cornéenne *in vivo* et *in situ* capable de saisir les subtilités biomécaniques impliquées lors d'un CXL.

## VII - Bibliographie

1. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1980;31:435-441.
2. Nash IS, Greene PR, Foster CS. Comparison of mechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1982;35:413-424.
3. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 2003;29:1780-1785.
4. Djojtyan GP, Kurtz RM, Fernandez DC, Juhasz T. An analytically solvable model for biomechanical response of the cornea to refractive surgery. *J Biomech Eng* 2001;123:440-445.
5. Khohtali S, Colin J, Touboul D, Binder PS. (2010). Does photorefractive keratectomy affect keratoconus progression? *Journal of refractive surgery (Thorofare, N.J. : 1995)*, 26(12), 925–6.
6. Boote C. et al, Lamellar orientation in human cornea in relation to mechanical properties. *J Struct Biol*, 2005. 149(1): p. 1-6.
7. Winkler M, Chai D, Kriling S, Nien CJ, Brown DJ, Jester B, Juhasz T et al. (2011). Nonlinear optical macroscopic assessment of 3-D corneal collagen organization and axial biomechanics. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(12), 8818–27.
8. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Survey of ophthalmology*. 1998. 42(4) : 297-319.
9. Xiaohui Li, Huiying Yang, Yaron S. Rabinowitz. (2013). Longitudinal study of keratoconus progression, 85(4), 502–507.
10. Fournié P., Touboul D, Arné JL, Colin J, Malecaze F. (2013). [Keratoconus.]. *Journal français d'ophtalmologie. J Fr Ophtalmol*. 2013 Sep; 36(7):618-26.
11. Mocan MC, Yilmaz PT, Irkeç M, Orhan, M. (2008). In vivo confocal microscopy for the evaluation of corneal microstructure in keratoconus. *Current eye research*, 33(11), 933–9.
12. Patel D, McGhee C. (2013). Understanding keratoconus: what have we learned from the New Zealand perspective? *Clinical & experimental optometry : journal of the Australian Optometrical Association*, 96(2), 183–7.
13. Nemeth G, Hassan Z, Csutak A, Szalai E, Berta A, Modis L Jr. Repeatability of ocular biomechanical data measurements with a Scheimpflug-based noncontact device on normal corneas. *J Refract Surg*. 2013 Aug;29(8):558-63.
14. Grabner, G., Eilmsteiner, R., Steindl, C., Ruckhofer, J., Mattioli, R., & Husinsky, W. (2005). Dynamic corneal imaging. *Journal of cataract and refractive surgery*, 31(1), 163–74
15. Kling S, Marcos S. (2013). Contributing factors to corneal deformation in air puff measurements. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(7), 5078–85.
16. Touboul, D., Bénard, A., Mahmoud, A. M., Gallois, A., Colin, J., & Roberts, C. J. (2011). Early biomechanical keratoconus pattern measured with an ocular response analyzer: curve analysis. *Journal of cataract and refractive surgery*, 37(12), 2144–50.
17. Kling S, Marcos S. (2013). Finite-element modeling of intrastromal ring segment implantation into a hyperelastic cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(1), 881–9.

18. Roy AS, Dupps WJ. (2011). Patient-specific computational modeling of keratoconus progression and differential responses to collagen cross-linking. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(12), 9174–87.
19. Rabinowitz YS, Yang H, Brickam Y, Akkina J, Riley C, Rotter JJ, et al. Videokeratography database of normal human corneas. *Br J Ophthalmol* 1996;80:610-6.
20. Alio JL, Shabayek MH. Corneal higher order aberrations: a method to grade keratoconus. *J Refract Surg* 2006; 22:539-45.
21. Krumeich JH, Daniel J, Knulle A. Live-epikeratophakia for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:456-63.
22. Lewis PN et al. Structural interactions between collagen and proteoglycans are elucidated by three-dimensional electron tomography of bovine cornea. *Structure*, 2005. 18(2): p. 239-45.
23. Spoerl E, Huhle M, Kasper M, Seiler T. Erho. Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking. *Ophthalmologe*. 1997;94: 902–906.
24. Ricard-Blum S, Ville G. (1989). Collagen cross-linking. *The International journal of biochemistry*, 21(11), 1185–9.
25. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. (2007). Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*, 26(4), 385–9.
26. Kissner A, Spoerl E, Jung R, Spekl K, Pillunat LE, Raiskup F. (2010). Pharmacological modification of the epithelial permeability by benzalkonium chloride in UVA/Riboflavin corneal collagen cross-linking. *Current eye research*, 35(8), 715–21.
27. Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, Caporossi T, Caporossi A. (2009). Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *Journal of cataract and refractive surgery*, 35(5), 893–9.
28. Mc Call AS, Kraft S, Edelhauser HF et al. “Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA),” *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 51, no. 1, pp. 129–138, 2010
29. Dhawan S, Rao K, Natrajan S. Complications of corneal collagen cross-linking. *Journal of ophthalmology*. 2011, 869015.
30. Sharma A, Nottage JM, Mirchia K, Sharma R, Mohan K, Nirankari VS. (2012). Persistent corneal edema after collagen cross-linking for keratoconus. *American journal of ophthalmology*, 154(6), 922–926.e1.
31. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. (2007). Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*, 26(4), 385–9.
32. Gkika M, Labiris G, Kozobolis V. (2011). Corneal collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A irradiation: a review of clinical and experimental studies. *International ophthalmology*, 31(4), 309–19.
33. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. (2004). Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye (London, England)*, 18(7), 718–22.
34. Wollensak G, Herbst H. (2010). Significance of the lacunar hydration pattern after corneal cross linking. *Cornea*, 29(8), 899–903.

35. Touboul, D., Efron, N., Smadja, D., Praud, D., Malet, F., & Colin, J. (2012). Corneal Confocal Microscopy Following Conventional, Transepithelial, and Accelerated Corneal Collagen Cross-linking Procedures for Keratoconus. *Journal of refractive surgery (Thorofare, N.J. : 1995)*, 28(11), 769–76.
36. Kanellopoulos J, Asimellis G. (2013). Introduction of quantitative and qualitative cornea optical coherence tomography findings induced by collagen cross-linking for keratoconus: a novel effect measurement benchmark. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 7, 329–35.
37. Matthes R. Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Phys.* 2004; 87:171–186
38. Wernli J, Schumacher S, Spoerl E, Mrochen M. (2013). The efficacy of corneal cross-linking shows a sudden decrease with very high intensity UV light and short treatment time. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(2), 1176–80.
39. Cinar Y, Cingü AK, Türkcü FM, Cinar T, Yüksel H, Ozkurt,ZG, Çaça I. (2013). Comparison of accelerated and conventional corneal collagen cross-linking for progressive keratoconus. *Cutaneous and ocular toxicology*, 9527, 1–5.
40. Richoz O, Hammer A, Tabibian D, Gatzoufas Z, Hafezi F. (2013). The Biomechanical Effect of Corneal Collagen Cross-Linking (CXL) With Riboflavin and UV-A is Oxygen Dependent. *Translational vision science & technology*, 2(7), 6.
41. Schumacher S, Mrochen M, Wernli J, Bueeler M, Seiler T. (2012). Optimization model for UV-riboflavin corneal cross-linking. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(2), 762–9.
42. Schumacher S, Oeftiger L, Mrochen, M. (2011). Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin and ultraviolet radiation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(12), 9048–52.
43. Filippello M, Stagni E, O'Bart, D. (2012). Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study. *Journal of cataract and refractive surgery*, 38(2), 283–91.
44. Koppen C, Wouters K, Mathysen D, Rozema J, Tassignon MJ. (2012). Refractive and topographic results of benzalkonium chloride-assisted transepithelial crosslinking. *Journal of cataract and refractive surgery*, 38(6), 1000–5.
45. Aouni AEI, Rouic JLe, Parel J, Renard G, Chauvaud, D. (2001). Iontophorèse : revue de littérature et perspectives. General mechanism of iontophoretic drug delivery introduction conclusions. (1), 319–327.
46. Bikbova G, Bikbov M. (2013). Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin. *Acta ophthalmologica*. 2013, 1-5.
47. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T, Paradiso AL. (2012). Transepithelial corneal collagen crosslinking for keratoconus: qualitative investigation by in vivo HRT II confocal analysis. *European journal of ophthalmology*, 22 Suppl 7, S81–8.
48. Wollensak G, Spoerl E. (2004). Collagen crosslinking of human and porcine sclera. *Journal of cataract and refractive surgery*, 30(3), 689-95.
49. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. (2004). Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea*, 23(1), 43–9.
50. Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. (2007). Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *Journal of cataract and refractive surgery*, 33(3), 516–21.

51. Cordeiro Barbosa MMV, Barbosa JB, Hirai, FE, Hofling-Lima AL. (2010). Effect of cross-linking on corneal thickness in patients with corneal edema. *Cornea*, 29(6), 613–7.
52. Dhaliwal JS, Kaufman SC. (2009). Corneal collagen cross-linking: a confocal, electron, and light microscopy study of eye bank corneas. *Cornea*, 28(1), 62–7.
53. Akhtar S, Almubrad T, Paladini I, Mencucci R. (2013). Keratoconus corneal architecture after riboflavin/ultraviolet A cross-linking: ultrastructural studies. *Molecular vision*, 19(February), 1526–37.
54. Bueno JM, Gualda EJ, Giakoumaki A, Pérez-Merino P, Marcos S, Artal P. (2011). Multiphoton microscopy of ex vivo corneas after collagen cross-linking. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(8), 5325–31.
55. Tan HY, Chang YL, Lo W, Hsueh CM, Chen WL, Ghazaryan A, Hu PS et al. (2013). Characterizing the morphologic changes in collagen crosslinked-treated corneas by Fourier transform-second harmonic generation imaging. *Journal of cataract and refractive surgery*, 39(5), 779–88.
56. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of cross-linked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 2004; 29:35–40
57. Kobayashi AS, Staberg LG, Schlegel WA. Viscoelastic Properties of Human Cornea. *Experimental Mechanics* 1973;497-503.
58. Lakes RS. Viscoelastic solids. Boca Raton: CRC Press; 1999:15-61.
59. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. (1998). Induction of cross-links in corneal tissue. *Experimental eye research*, 66(1), 97–103.
60. Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Wittig C, Pillunat LE. (2006). Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *Journal of cataract and refractive surgery*, 32(2), 279–83.
61. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. (2003). Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 29(9), 1780–1785.
62. Wollensak G, Iomdina E. (2009). Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta ophthalmologica*, 87(1), 48–51.
63. He X, Spoerl E, Tang, J, Liu J. (2010). Measurement of corneal changes after collagen crosslinking using a noninvasive ultrasound system. *Journal of cataract and refractive surgery*, 36(7), 1207–12.
64. Beshtawi IM, Akhtar R, Hillarby MC, O'Donnell C, Zhao X, Brahma A, Carley F et al. (2013). Scanning acoustic microscopy for mapping the microelastic properties of human corneal tissue. *Current eye research*, 38(4), 437–44.
65. Kling S, Remon L, Pérez-Escudero A, Merayo-Llodes J, Marcos S. (2010). Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(8), 3961–8.
66. Dorronsoro C, Pascual D, Pérez-Merino P, Kling S, Marcos S. (2012). Dynamic OCT measurement of corneal deformation by an air puff in normal and cross-linked corneas. *Biomedical optics express*, 3(3), 473–87.
67. Ford MR, Dupps WJ, Rollins AM, Roy AS, Hu Z. (2011). Method for optical coherence elastography of the cornea. *Journal of biomedical optics*, 16(1), 016005.

68. Armstrong BK, Lin MP, Ford MR, Santhiago MR, Singh V, Grossman GH, Agrawal V et al. (2013). Biological and biomechanical responses to traditional epithelium-off and transepithelial riboflavin-UVA CXL techniques in rabbits. *Journal of refractive surgery (Thorofare, N.J. : 1995)*, 29(5), 332–41.
69. Dupps Jr, MD, PhD, Marcelo V. Netto, MD, Satish Herekar, MSEE, and R. R., & Krueger, MD, M. (2007). Surface Wave Elastometry of the Cornea in Porcine and Human Donor Eyes, 23(1), 66–75.
70. Rocha, K. M., Ramos-Esteban, J. C., Qian, Y., Herekar, S., Krueger, R. R. (2008). Comparative study of riboflavin-UVA cross-linking and “flash-linking” using surface wave elastometry. *Journal of refractive surgery (Thorofare, N.J. : 1995)*, 24(7), S748–51.
71. Pron G, Ieraci L, Kaulback K. (2011). Collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet-a for corneal thinning disorders: an evidence-based analysis. *Ontario health technology assessment series* Vol. 11, pp. 1–89.
72. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. (2003). Riboflavin/ultraviolet-a–induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*, 135(5), 620–627.
73. Suri K, Hammersmith KM, Nagra PK. (2012). Corneal collagen cross-linking: ectasia and beyond. *Current opinion in ophthalmology*, 23(4), 280–287.
74. Wittig-silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. Keratoconus : Preliminary Results. *Journal of réfractive surgery*. Sept 2008, Vol 24, S720-725.
75. Wittig-Silva C, Chan E, Islam FMA, Wu T, Whiting M, Snibson GR. (2014). A Randomized, Controlled Trial of Corneal Collagen Cross-Linking in Progressive Keratoconus: Three-Year Results. *Ophthalmology*. 2014 Jan 4. pii: S0161-6420(13)01004-X.
76. Goldich Y, Barkana Y, Wussuku Lior O, Marcovich AL, Hirsh A, Avni I, Zadok D. (2014). Corneal collagen cross-linking for the treatment of progressive keratoconus: 3-year prospective outcome. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 49(1), 54–9.
77. Asri D, Touboul D, Fournié P, Malet F, Garra C, Gallois A, Malecaze F et al. (2011). Corneal collagen crosslinking in progressive keratoconus: multicenter results from the French National Reference Center for Keratoconus. *Journal of cataract and refractive surgery*, 37(12), 2137–43.
78. Chatzis N, Hafezi F. Progression of keratoconus and efficacy of pediatric [corrected] corneal collagen cross-linking in children and adolescents. *J Refract Surg*. 2012 Nov;28(11):753-8. doi: 10.3928/1081597X-20121011-01.
79. Hafezi F. (2011). Limitation of collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution: failure in an extremely thin cornea. *Cornea*, 30(8), 917–9.

## Chapitre 2

### Du concept de l'élastographe cornéen à l'évaluation expérimentale de la photo-polymérisation du collagène cornéen

---

#### Sommaire

I- Introduction .....	162
II - Adaptation des caractéristiques techniques de la sonde échographique SSI à la cornée et aux conditions d'expérimentations.....	163
1. Particularités technologiques de l'élastographe cornéen haute fréquence.....	163
2. Validation des algorithmes de calcul du temps de vol des ondes de cisaillement dans la cornée.....	166
III- Résultats expérimentaux .....	167
1. Imagerie de la cornée et évaluation et de la relation élasticité-pression <i>ex vivo</i> .....	167
2. Evaluation de l'anisotropie cornéenne.....	171
3. Evaluation du CXL conventionnel (C-CXL).....	172
IV – Conclusion du chapitre.....	176
V – Bibliographie.....	177



## I – Introduction

Notre projet d'élastographe cornéen par analyse des ondes de cisaillement est issu de la collaboration entre le CHU de Bordeaux et l'institut Langevin. Il s'inscrit dans le cadre d'une ANR TechSan qui fut subventionnée pour 3 ans sous l'appellation « **Projet Microélasto** ». Ce projet comportait un volet ophtalmologique associés à deux autres volets, dermatologique et vétérinaire, qui ne seront pas détaillés ici. Historiquement, je fus co-initiateur de ce projet suite à ma première rencontre avec le Dr. Mickael Tanter en septembre 2007. Une première publication dans IEEE, sortie en 2009, a secondairement été le point de départ de la rédaction de l'ANR Microelasto obtenue par l'ESPCI en janvier 2010. J'ai ensuite pu participer aux différentes étapes du projet avec une implication personnelle variable.

Le travail de recherche accompli peut être divisé en plusieurs étapes :

1. Adaptation des caractéristiques techniques de la sonde échographique SSI à la cornée et aux conditions d'expérimentations
2. Validation des algorithmes de calcul du temps de vol des ondes de cisaillement dans la cornée
3. Evaluation et de la relation élasticité-pression *ex vivo* (porcin)
4. Evaluation de l'anisotropie *ex vivo* (porcin)
5. Evaluation du *corneal collagen cross linking* cornéen conventionnel (C-CXL) *ex vivo* puis *in vivo* (porcin)
6. Evaluation du CXL trans-épithélial assisté par iontophorèse (I-CXL) *in vivo* (lapins) – Histologie
7. Validation de l'innocuité échographique (lapins) – Histologie
8. Cahier des charges pour le travail sur l'interface œil/machine en clinique
9. Réflexions sur un modèle expérimental humain pour évaluation du CXL
10. Préparation d'un CPP pour validation clinique (Kératocône, glaucome, presbytie)

Les étapes 1 à 5 ont fait l'objet de la thèse de science du Dr. TM Nguyen (soutenue fin 2012), les étapes 6 à 10 font le cœur de mon travail de thèse rapporté ici. Afin de comprendre le cheminement de cette deuxième thèse sur l'élastographie cornéenne, un rappel des principaux développements engagés préalablement ainsi que le résumé des essais réalisés sur les cornées porcines est nécessaire et fera donc l'objet de ce troisième chapitre.

## II - Adaptation des caractéristiques techniques de la sonde échographique SSI à la cornée et aux conditions d'expérimentations

### 1. Particularités technologiques de l'élastographe cornéen haute fréquence

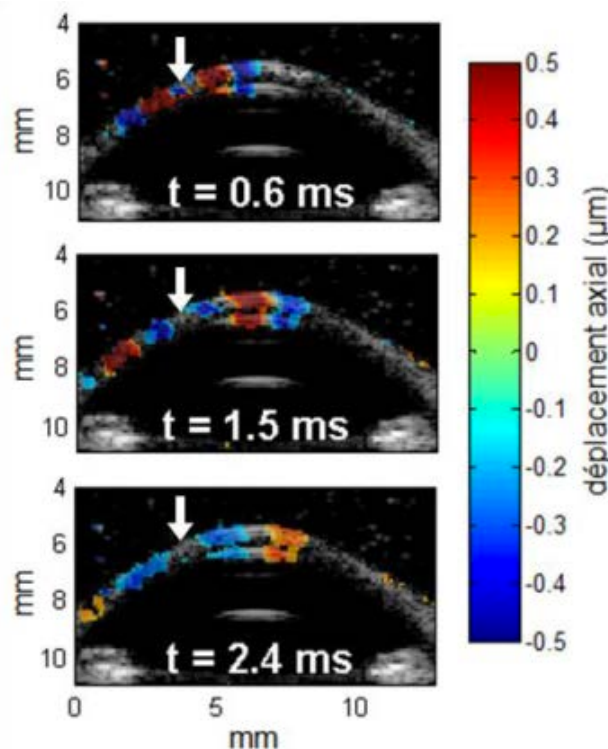
La technologie SSI a initialement été appliquée à l'imagerie des tissus mous et glandulaires comme le sein, la prostate, la thyroïde, le foie.<sup>1</sup> La transition vers des structures beaucoup plus denses et de petites épaisseurs a nécessité un développement très spécifique de la sonde et du traitement du signal. Les rappels ci-dessous mettent l'accent sur les points importants à considérer pour comprendre le cahier des charges de l'élastographe dédié à l'application cornéenne.

La particularité de la technologie SSI est de pouvoir utiliser la même sonde échographique pour à la fois stimuler le tissu et enregistrer sa réaction.<sup>2</sup>

Ce principe permet d'atteindre des cadences d'imagerie ultra-rapides nécessaires (> 20000 images/sec), compte tenu de la vitesse de propagation des ondes de cisaillement dans les tissus biologiques (paquet d'ondes dont le spectre en fréquence varie approximativement entre 200 et 1500 Hz) qui est de l'ordre du mètre par seconde.<sup>3</sup>

Ainsi, la cornée, mesurant environ 12 mm de diamètre en moyenne, est traversée en seulement quelques millisecondes. Pour éviter les rebonds échographiques aux limites, l'analyse doit être encore plus rapide et ne fut uniquement possible qu'avec l'optimisation réalisée sur l'échographe Aixplorer® par la société Supersonic Imagine. L'astuce consiste essentiellement à supprimer l'étape de focalisation en émission puisqu'un seul tir non focalisé est utilisé pour insonifier simultanément tous les points du plan d'imagerie. L'image est ensuite reconstruite et retravaillée par la méthode du « *beamforming* en réception ». Pour augmenter la qualité de l'image et le ratio signal/bruit, plusieurs tirs sont successivement enregistrés et une sommation des signaux permet d'optimiser le résultat (méthode du *compound spatial cohérent*). Dans cette approche, le tissu est scruté avec des ondes planes ultrasonores d'inclinaisons différentes ce qui permet de reconstruire une image avec un minimum de bruit de fond. L'ensemble des images est alors stocké dans l'élastographe. Par intercorrélation des différentes images ultrasonores acquises un film des déplacements de l'onde de cisaillement est reconstruit. Puis un calcul du temps de vol sur ce dernier, permet

ensuite de remonter aux propriétés visco-élastiques du milieu. Une cartographie des vitesses de cisaillement ou du module de Young en 2D est ainsi réalisée.<sup>4</sup> Cf. **Figure 55**.



**Figure 55:** Illustration de la propagation d'un paquet d'ondes de cisaillement induit par une poussée ultrasonore unique dans une cornée porcine, *ex vivo* (flèche). Analyse en mode élastographique (superposé au mode B échographique) à 0,6 ; 1,5 et 2,4 ms montrant la position des ondes et leur vitesse de progression. Les pixels figurés en rouge représentent la zone de déflexion axiale maximale du train d'ondes. Nguyen et al, 2012.

Dans le cas de l'examen de la cornée, l'augmentation de la fréquence de la sonde est nécessaire pour améliorer la résolution spatiale de l'image (par diminution de la longueur d'onde). Elle permet aussi la réduction de l'atténuation du signal en profondeur (pénétration). La fréquence basale de la technologie a ainsi été augmentée de 8 MHz à 15 ou 20 MHz en fonction des expérimentations. Cf. **Figure 56**.



**Figure 56 :** Illustration des différentes sondes échographiques utilisées pour l'élastographie cornéenne. Source ESPCI.

Cependant, les ultrasons peuvent avoir un impact sur les tissus si leur puissance acoustique est trop élevée (phénomènes mécaniques et thermiques). Dans le cadre de l'élastographie de l'ensemble des organes du corps, ces normes permettent d'appliquer la technique sans problème, cependant, les normes de sécurité ultrasonores établies par la FDA (*Food and Drug Administration*) sont beaucoup plus strictes pour l'œil que pour les autres organes. Elles imposent des tests d'innocuité afin de pouvoir obtenir la conformité et passer à des études sur l'humain. Il faut souligner que ces normes ont été initialement définies pour les applications d'imagerie de la rétine, tissu bien plus susceptible que la cornée ou le cristallin. Ainsi, après quelques essais préliminaires sur la cornée humaine, il s'est avéré que les puissances ultrasonores requises pour obtenir une image de qualité dépasseraient vraisemblablement les limites définies pour l'Ophtalmologie. L'essai clinique initialement prévu dans l'ANR (cohorte de patients porteurs d'un kératocône ou d'un glaucome) ne pouvait donc plus voir le jour en raison de ce problème de norme, remettant en cause le marquage CE de l'élastographe pour cette application. Afin d'obtenir sereinement les accords par les autorités sanitaires en vue d'une étude clinique, des tests d'innocuités ont ainsi été programmés sur modèle lapin pour démontrer la possibilité de dépasser les normes FDA sans risque intra oculaire, et en particulier rétinien (**Cf. Chapitre 4**). En parallèle, des études sont projetées pour réduire les puissances émises tout en conservant un rapport signal sur bruit suffisant pour détecter la propagation des ondes de cisaillement dans la cornée. Il serait par exemple possible de cumuler des tirs successifs à différents endroits, ou de fabriquer une nouvelle sonde haute fréquence sans focalisation en élévation pour diminuer la pression maximale dans le plan d'imagerie tout en profitant d'un plus large volume de poussée.

## 2. Validation des algorithmes de calcul du temps de vol des ondes de cisaillement dans la cornée

Dans le cas de la cornée, il s'agit d'étudier une fine lamelle tissulaire baignée par le milieu de couplage échographique et par l'humeur aqueuse. Dans ces conditions, les ondes de compression se propagent donc comme dans un milieu homogène infini, tandis que les ondes de cisaillement sont guidées par la géométrie de la cornée. La dispersion induite par la viscosité du milieu est alors négligeable devant la dispersion induite par le guidage d'onde. En conséquence, dans le cas d'une plaque mince viscoélastique, on peut déterminer l'élasticité indépendamment de la viscosité du milieu par analyse de la courbe de dispersion. La viscosité peut ensuite être déduite de la mesure de l'atténuation.

Afin de proposer une modélisation réaliste de la cornée, celle-ci peut être assimilée à une plaque fine immergée dans un liquide. Dans ce cas, la plaque et le milieu extérieur constituent un milieu homogène du point de vue des ondes de compression, mais présentent un fort contraste de module de cisaillement qui entraîne le guidage des ondes de cisaillement. L'approximation analytique est alors la méthode la plus simple pour prédire la courbe de dispersion puisqu'il suffit d'appliquer l'équation suivante pour obtenir la vitesse de phase  $v_\phi$  de ces ondes:

$$v_\phi = \sqrt{\frac{h\omega c_T}{2\sqrt{3}}}$$

Où  $h$  est l'épaisseur de la plaque,  $\omega$  la fréquence de pulsation, et  $c_T$  la vitesse de l'onde de cisaillement. Typiquement, les épaisseurs  $h$  variant de 500  $\mu\text{m}$  à 1,5 mm, les vitesses transverses  $c_T$  variant de 8 à 20 m/s, les fréquences  $\omega$  variant de 500 à 1500 Hz. <sup>6</sup>

	épaisseur (mm)	vitesse transverse (m/s)	vitesse longitudinale (m/s)	densité (kg/m <sup>3</sup> )
cornée	~0.5-0.9 [2]	~ 20 [2]	1610 [2]	1000 [2]

La valeur du module d'élasticité est secondairement calculée pour chaque fréquence avec la formule :

$$E = 3\mu = 3\rho c_T^2$$

Par ailleurs, il a pu être démontré par le Dr TM Nguyen que la viscosité du milieu n'a pas d'influence sur la courbe de dispersion des ondes guidées.<sup>7</sup> Autrement dit, la dispersion induite par la viscosité du milieu est négligeable devant la dispersion induite par le guidage d'onde (c'est-à-dire par la géométrie du milieu). En conséquence, dans le cas d'une plaque mince viscoélastique, on peut déterminer l'élasticité indépendamment de la viscosité du milieu par la courbe de dispersion. La viscosité peut cependant ensuite être déduite de la mesure de l'atténuation.

### III – Résultats expérimentaux

#### 1. Imagerie de la cornée et évaluation et de la relation élasticité-pressure *ex vivo*

La mesure de l'élasticité cornéenne sur modèle expérimental *ex vivo* est délicate car l'élasticité est fortement corrélée à de nombreux paramètres physiques et biologiques parfois difficile à réguler à un instant précis mais aussi dans le temps. L'élasticité, ou la dureté du tissu, est fonction de :

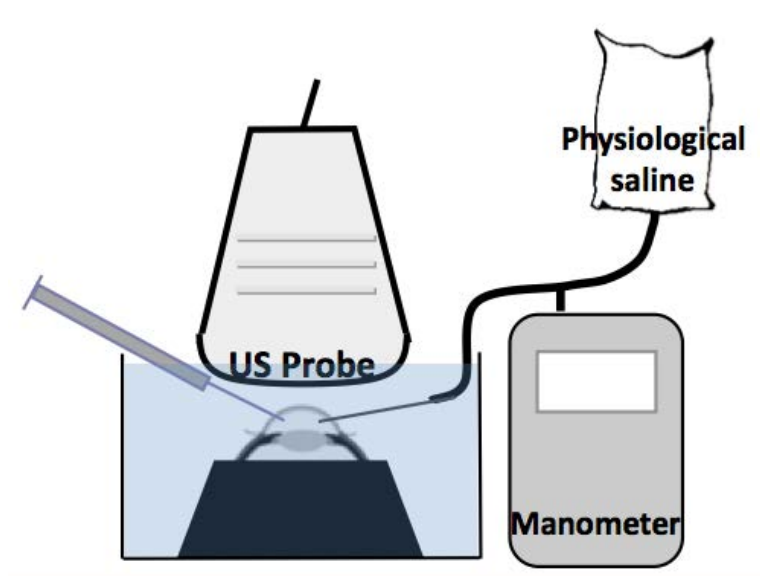
- La trophicité, de l'intégrité biologique du tissu, variable dépendant de la qualité des prélèvements, de la conservation, du délai d'examen post mortem, la présence ou non d'un épithélium intègre (non perméable),
- La qualité du montage de la cornée sur une chambre antérieure artificielle (CAA - centrage, bulles) ou de l'implantation d'une sonde d'inflation dans le globe entier.
- La tension de surface exercée à sa face postérieure (pression d'inflation),
- L'épaisseur du tissu, directement reliée à l'espèce et à son taux d'hydratation, facilement perturbée par le milieu échographique (immersion),
- La durée d'examen en immersion, des effets de diffusions osmotiques entre le bain échographique et le tissu,
- La qualité microstructurale de la cornée selon l'âge et l'espèce.

Pour étudier les variations de l'élasticité en fonction d'une seule variable d'intérêt, et en l'occurrence la valeur de l'élasticité, il faut pouvoir limiter les biais expérimentaux et faire plusieurs mesures pour moyenner les données. Il faut donc un moyen d'assurer un suivi continu des principaux paramètres évoqués tout au long des expériences. **Cf. Figure 57.**

Les deux variables d'intérêt principales à contrôler pour l'expérimentation *ex vivo* sont:

- (1) Le taux d'hydratation, mesuré de manière indirecte par la pachymétrie à ultrasons (US) de la cornée. L'assomption étant de dire que dans la structure lamellaire de la cornée, plus le taux d'hydratation est fort plus la cornée est épaisse. La connaissance de l'épaisseur moyenne normale de la cornée de porc (650  $\mu\text{m}$ ), de lapin (400  $\mu\text{m}$ ) et humaine (550  $\mu\text{m}$ ) permet de savoir empiriquement si le modèle étudié est proche des conditions physiologiques. Par ailleurs, l'arrêt de la pompe endothéliale en post mortem induit spontanément un œdème de cornée dont la vitesse d'imbibition dépend fortement du milieu de conservation (elle se comporte passivement comme une éponge). Ainsi, les lois de l'osmose dominent le statut pachymétrique des boutons cornéens. Les solutions de conservation contiennent habituellement des macromolécules inertes, comme le Dextran, capable de freiner ou limiter la turgescence tissulaire. Certains mélanges permettent d'inverser le processus d'imbibition post mortem, et d'obtenir une déturgescence osmotique en quelques heures. Si la cornée est à nouveau d'épaisseur physiologique et transparente, elle est possiblement plus ou moins fine, plus ou moins compactée par rapport à son état naturel, infiltrée par des molécules aux vertus osmotiques, inhabituellement présentes en son sein. En ce sens, l'analyse *ex vivo* du processus de photo-polymérisation ou Photo-réticulation du collagène par CXL, faisant intervenir les relations intimes entre les fibres de collagène et la substance fondamentale, peut être implicitement biaisée.
- (2) La pression d'inflation régnant dans la CAA, suivie en mmHg est normalement bien évaluée par manométrie, plus facilement que dans l'approche *in vivo* qui sera détaillée plus loin.

**Le montage expérimental utilisé lors des essais sur modèle porcin était le suivant :**

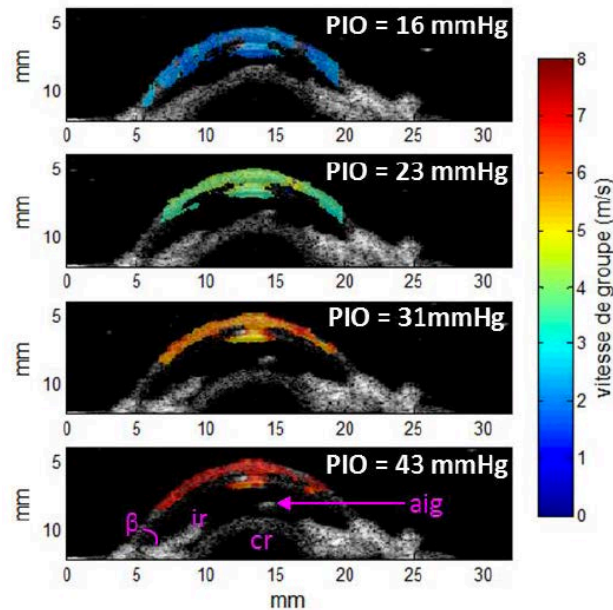


**Figure 57 :** Montage expérimental pour l'élastographie sur cornées porcines, montées *ex vivo* sur CAA avec contrôle manométrique de la pression d'inflation. Source ESPCI.

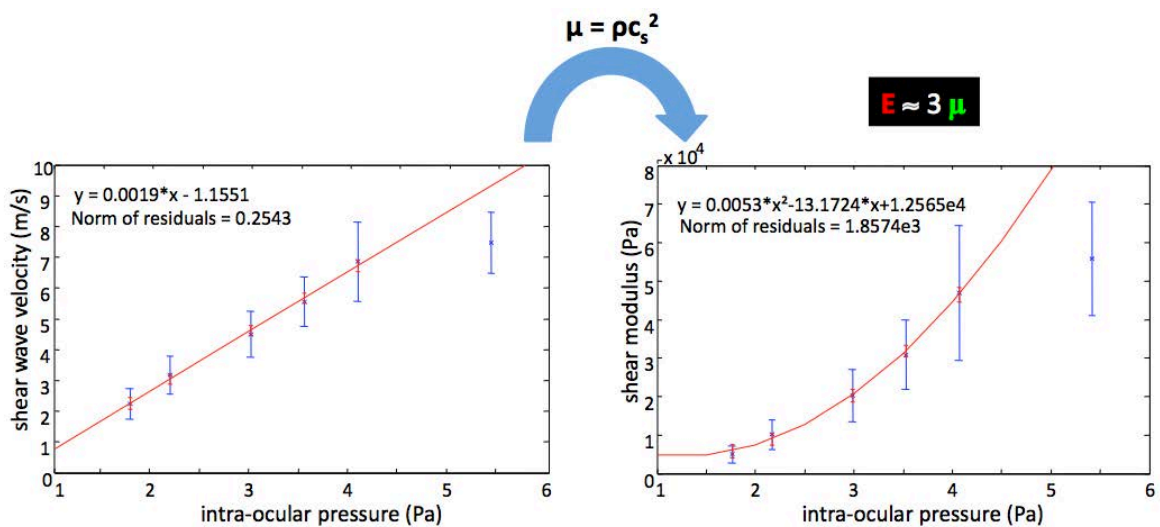
La sonde était positionnée à la verticale d'un globe oculaire porcin stabilisé dans un support creux, le tout positionné au fond d'un bac d'immersion. Une aiguille fine (32 G) était plantée délicatement dans la chambre antérieure en évitant l'inflation de bulle de gaz, une deuxième permettait de réaliser le monitoring manométrique et l'infusion à pression constante.

Il a ainsi été possible d'obtenir certains résultats préliminaires démontrant la bonne sensibilité de l'élastographie SSI à la mise en tension du tissu cornéen porcin *ex vivo*. **Cf. Figures 58-59.** Une relation linéaire entre la vitesse de l'onde de cisaillement et la pression dans la CAA avait été suggérée avec toutefois un effet de saturation une fois arrivé en régime à hautes pressions. Ce premier montage subissait bien sur les biais liés au modèle *ex vivo* sus mentionnés.





**Figure 58 :** Variation de la vitesse de groupe de la cornée en fonction de la pression d'inflation en mmHg (PIO). Source TM Nguyen, ESPCI.



**Figure 59:** Evolution assez linéaire de la vitesse des ondes en fonction de la pression d'inflation des cornées porcines en Pa. La traduction en kPa est une parabole en raison de la variation au carré de la vitesse. Source TM Nguyen, ESPCI.

Comme expliqué plus bas, ce test d'inflation sur modèle porcin n'a pas pu être réalisé *in vivo* car il est difficile de faire varier faiblement la PIO chez l'animal vivant en raison de l'accès au globe oculaire déjà bien enclavé sous la sonde d'examen.

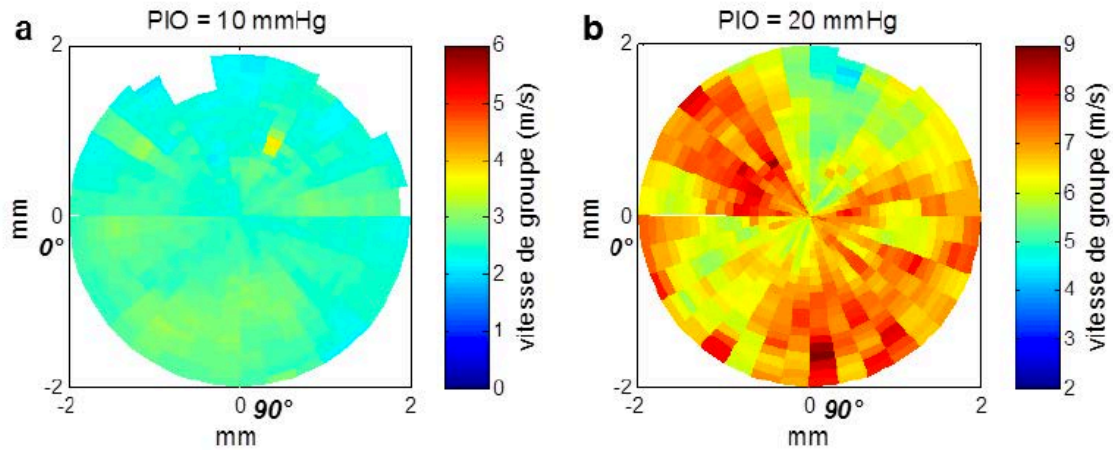
## 2. Evaluation de l'anisotropie cornéenne

Plusieurs yeux porcins ont pu être examinés *in vivo* lors d'anesthésies générales. Le modèle porcine a cependant démontré d'importantes limitations pour réaliser des mesures reproductibles. En effet, du fait des mouvements respiratoires et des battements cardiaques, nous avons pu observer des fluctuations de la dureté de la cornée non négligeables. Le Dr TM Nguyen a dû développer un asservissement des acquisitions à la systole cardiaque du porc afin de mesurer l'élasticité en temps réel. L'objectif était d'obtenir la carte d'anisotropie élastique de la cornée *in vivo* par rotation de la sonde sur 360° (19 coupes par pas de 20°). **Cf. Figure 60.**



**Figure 60 :** Présentation du montage de la sonde pour une rotation sur 360° au-dessus de l'œil d'un porc (*in vivo*). Source TM Nguyen, ESPCI.

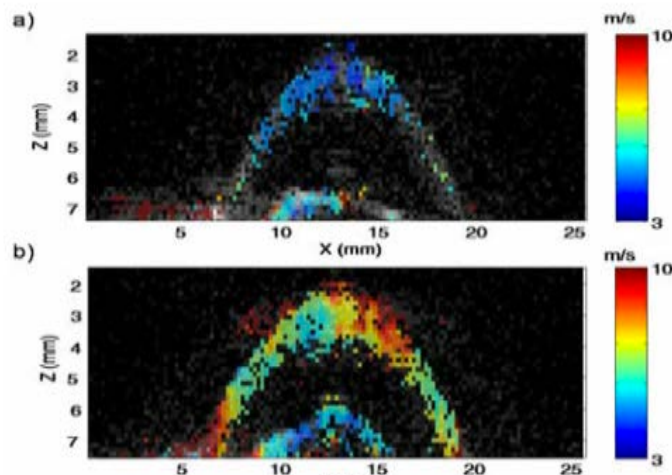
Comme illustré plus bas, la carte d'anisotropie a pu démontrer des zones de renforcement cohérentes avec notre connaissance sur l'architecture biomécanique de la cornée porcine (**Cf. Chapitre 1; diffraction rayon X**). En pratique, ce n'est qu'après sacrifice des animaux et réalisation de la cartographie sous inflation du globe porcine plus importante que naturellement que les disparités élastiques ont pu être correctement révélées. Nous avons donc ici compris qu'il fallait jouer sur l'augmentation de la pression d'inflation afin de visualiser au mieux l'anisotropie naturelle du tissu cornéen. **CF. Figure 61.**



**Figure 61:** Carte d'anisotropie réalisée sur une cornée porcine, *in vivo* (a) et *ex vivo* (b), juste après énucléation. Le renforcement biomécanique de l'axe horizontal est révélé après mise en tension du globe, *ex vivo*. Source TM Nguyen, ESPCI.

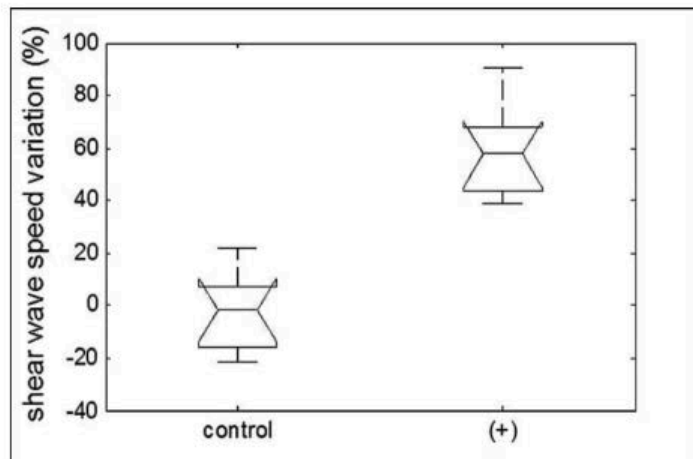
### 3. Evaluation du *Corneal Collagen Cross-linking* cornéen conventionnel (C-CXL)

Le C-CXL a bien sur été très vite testé pour montrer la pertinence de la technologie SSI dans les perspectives d'un nouvel outil d'imagerie utile en Ophtalmologie. Les premiers tests furent réalisés *ex vivo* sur cornées porcines.<sup>4</sup> Cf. Figure 62.



**Figure 62 :** Premier résultats sur cornées porcines, *ex vivo*, démontrant sur la cartographie des vitesses de groupe un durcissement d'environ 400 à 500% après CXL (image du bas). Tanter et al, 2009.

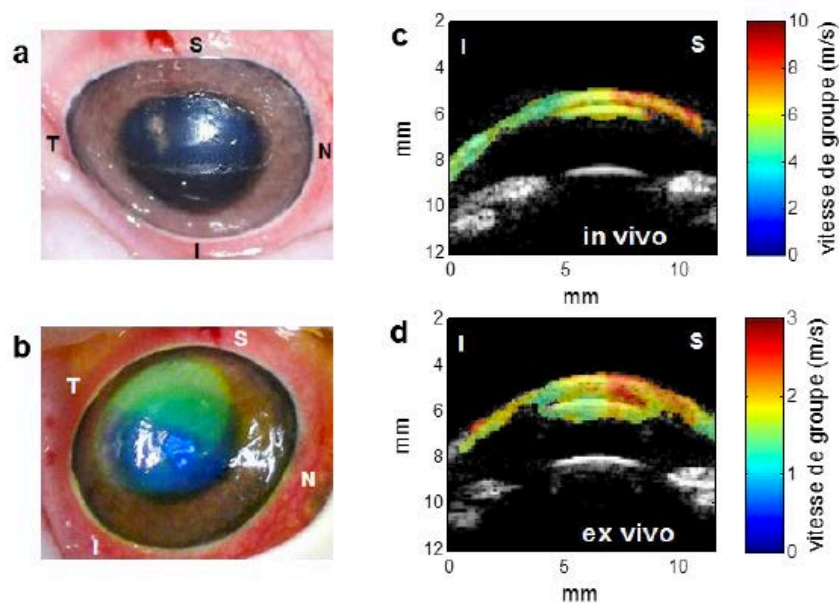
Une grande fluctuation des résultats a pu être constatée en raison des conditions d'hydratation et de fraîcheur des cornées. Globalement, nous avons pu démontrer une accélération de l'onde de cisaillement dans la zone traitée d'environ  $60 \pm 20\%$  (vitesse de groupe). L'importance des biais *ex vivo* pour le CXL nous a conduit à réaliser l'expérience *in vivo* sur le porc.<sup>5</sup> Cf. **Figure 63.**



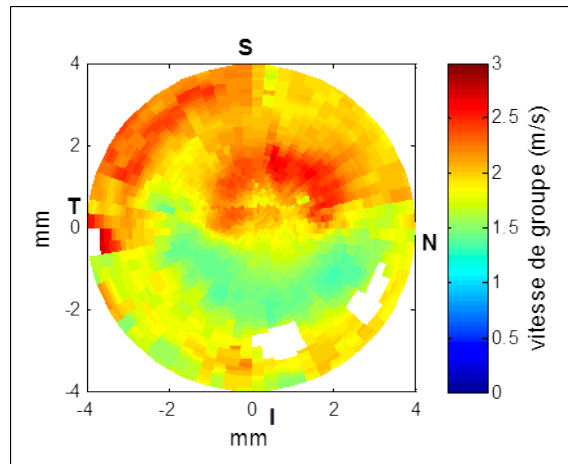
**Figure 63 :** Résultats de l'augmentation moyenne de la vitesse des ondes de cisaillement après CXL pour des cornées porcines traitées par CXL, *ex vivo* (n=5). Le groupe contrôle fut désépithélialisé et imprégné de riboflavine, le groupe (+) subissait un CXL mais nous n'avons pas fait de corrélation avec la pachymétrie cornéenne. Nguyen et al, 2012.

Une approche originale, fut de pratiquer le CXL *in vivo* de manière sectoriel. La polymérisation du collagène, est ainsi mesurée par analyse différentielle du durcissement entre les deux secteurs opposés du tissu, limitant les biais intra et extra individuels. En effet, comme tous les paramètres sont possiblement imbriqués dans l'efficacité de la photo-polymérisation, une exposition différentielle du tissu est préconisée. Une moitié du tissu étant seulement exposée aux UV-A, l'autre moitié cachée, permettant de comparer le gradient de durcissement ou l'anisotropie radiale avec un niveau de biais expérimental relativement constant entre les zones d'intérêt (quadrants, méridiens). L'évaluation numérique pertinente n'est pas en valeur absolue d'élasticité mais en valeur relative ou en pourcentage à pression donnée. Nous avons ainsi mesuré une augmentation de vitesse de groupe de  $56 \pm 15\%$ . Il est à noter que les vitesses de groupe sont moyennées sur toute l'épaisseur cornéenne alors qu'il est communément admis que le CXL n'est effectif que sur le premier tiers antérieur de la cornée. Cependant, la résolution axiale actuelle de l'élastographie SSI (une centaine de microns) ne permet pas encore de distinguer l'élasticité des différentes couches de la cornée. Une série de

CXL hémi-sectoriels a montré qu'on peut très nettement délimiter sur les cartes élastographiques la zone affectée par le traitement. On a donc à la fois une information quantitative sur le durcissement induit par le traitement et une information spatiale. Nous avons observé que seule la zone d'abrasion épithéliale est affectée par le CXL. Cela confirme l'importance de retirer l'épithélium sur toute la zone traitée pour permettre l'absorption de la solution de riboflavine. Comme pour l'étude sur l'anisotropie, nous n'avons pas obtenu de cartographie de la surface cornéenne *in vivo* après le CXL. Il s'est en effet avéré difficile d'un point de vue pratique de positionner la sonde de façon à obtenir un écho propre de la cornée dans les 19 plans d'imagerie qui composent une cartographie 3D (rotation de la sonde de 0° à 380° par pas de 20°). En revanche, les cartographies 2D en monitoring immédiat ont pu démontrer, pour la première fois <sup>5</sup>, le durcissement de la cornée soumise au CXL conventionnel, *in vivo*. Cf. **Figures 64-65**. Amstrong et al ont pu le démontrer également en 2013, sur le lapin (à 2 mois post CXL), avec la technologie d'élastographie OCT.<sup>8</sup>



**Figure 64:** Réalisation du CXL sectoriel sur cornée porcine, *in vivo*, montrant le durcissement localisé uniquement dans la zone démunie de son épithélium. Nguyen et al, 2012.



**Figure 65 :** Carte d'anisotropie lors d'un CXL sectoriel supérieur *in vivo* sur cornée porcine, mesurée *ex vivo*, montrant le durcissement localisé uniquement dans la zone démunie de son épithélium. Nguyen et al, 2012.

Ces résultats furent très encourageants mais il reste toutefois de nombreuses avancées à concrétiser avant de pouvoir appliquer cette technique pour le monitoring du CXL ou le dépistage du KC chez l'homme. Il faudra en particulier réduire les puissances émises pour respecter les normes de sécurité requises par la FDA pour l'imagerie ultrasonore oculaire. D'autre part, il faudra optimiser les acquisitions 3D qui nécessitent dans les conditions actuelles une quinzaine de minutes pour 19 plans d'imagerie. Cette durée est principalement limitée par le temps d'enregistrement des données pour chaque plan d'imagerie et sera amenée à diminuer au fur et à mesure des développements apportés à l'élastographe. Egalement, atteindre une fréquence ultrasonore de 30 MHz, serait un atout supplémentaire pour l'utilisation de ce système en clinique.

## IV – CONCLUSION DU CHAPITRE 2

La première approche *in vivo* de l'élastographe cornéen a permis de démontrer la faisabilité technologique pour examiner la biomécanique cornéenne. Certaines limitations ont été surmontées pour optimiser les signaux issus de la sonde et obtenir une image plus raffinée. L'augmentation de la fréquence de la machine Explorer de 8 MHz à 15 MHz a permis d'augmenter la résolution spatiale nécessaire pour la cornée. Cependant, la dureté du tissu cornéen impose des poussées ultrasonores avec des seuils supérieurs aux normes oculaires établies. Cet aspect fut la base de l'étude d'un modèle animal et des essais d'innocuité sur le lapin, remplaçant l'étude clinique initialement prévue. Les algorithmes de convolution du signal en images ont bénéficié d'un développement mathématique particulier, adapté au cas de la propagation d'ondes de cisaillement dans les structures lamellaires immergées (ondes de Lamb).

Nos premiers résultats ont pu démontrer une corrélation positive entre la dureté cornéenne et la mise en tension des cornées par inflation de pression de globes porcins entiers. L'étape suivante a permis de vérifier le durcissement de la cornée porcine après CXL Conventionnel EPI-OFF (C-CXL). L'importance de fluctuation des résultats, liée au modèle *ex vivo* a motivé la réalisation de CXL sur yeux porcins vivants avec analyse *ex vivo* juste après énucléation. Une augmentation de la vitesse des ondes de cisaillement d'environ 50% a ainsi pu être constatée après C-CXL. La réalisation d'une analyse de coupes élastographiques radiales séquentielle sur 360° a permis d'établir une cartographie d'élasticité. Cette méthode a permis de réaliser un C-CXL sectoriel *in vivo* et démontrer le durcissement localisé uniquement à la zone désépithélialisée. Enfin, l'anisotropie naturelle de la cornée porcine, avant CXL, a pu être étudiée.

L'étape ultérieure, faisant l'objet du chapitre suivant et principal de cette thèse, fut de développer un modèle plus pur pour analyser l'effet du CXL, dissocié de la problématique des variations pachymétriques induites par l'abrasion épithéliale (hydratation fluctuante). La méthode de CXL trans-épithélial assistée par iontophorèse nous a ainsi paru être un bon candidat pour mettre au point un modèle expérimental d'évaluation du CXL par SSI.

## V – Bibliographie

1. Tanter M, Bercoff J, Athanasiou A, Deffieux T, Gennisson JL, Montaldo G, Muller M et al. Quantitative assessment of breast lesion viscoelasticity: initial clinical results using supersonic shear imaging. *Ultrasound in medicine & biology*, (2008). 34(9), 1373–86.
2. Sandrin L, Tanter M, Catheline S, Fink M. Shear modulus imaging with 2-D transient elastography. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, (2002). 49(4), 426–35.
3. Bercoff J, Tanter M, Muller M, Fink M. The role of viscosity in the impulse diffraction field of elastic waves induced by the acoustic radiation force. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2004 Nov;51(11):1523-36.
4. Deffieux T, Montaldo G, Tanter M, Fink M. Shear wave spectroscopy for in vivo quantification of human soft tissues visco-elasticity. *IEEE Trans Med Imaging*. 2009 Mar;28(3):313-22.
5. Tanter M, Touboul D, Gennisson JL, Bercoff J, Fink M. High-resolution quantitative imaging of cornea elasticity using supersonic shear imaging. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, (2009). 28(12), 1881–1893.
6. Nguyen TM, Aubry JF, Touboul D, Fink M, Gennisson JL, Bercoff J, Tanter M. Monitoring of Cornea Elastic Properties Changes during UV-A/Riboflavin-Induced Corneal Collagen Cross-Linking using Supersonic Shear Wave Imaging: A Pilot Study. *Investigative ophthalmology & visual science*. (2012). 53(9), 5948–54.
7. Brum J, Gennisson L, Nguyen TM, Benech N, Fink M, Negreira C. Application of 1-D transient elastography for the shear modulus assessment of thin-layered soft tissue: comparison with Supersonic Shear Imaging technique. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*. 2012. 59 ; 4 : 703-714.
8. Nguyen TM, Couade M, Bercoff J, Tanter M. Assessment of viscous and elastic properties of sub-wavelength layered soft tissues using Shear Wave Spectroscopy: theoretical framework and in vitro experimental validation”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*. 2011. 58; 11: 2305-2315.
9. Armstrong BK, Lin MP, Ford MR, Santhiago MR, Singh V, Grossman GH, Agrawal V et al. (2013). Biological and biomechanical responses to traditional epithelium-off and transepithelial riboflavin-UVA CXL techniques in rabbits. *Journal of refractive surgery (Thorofare, NJ : 1995)*, 29(5), 332–41.



## Chapitre 3

### **Evaluation par élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement de l'efficacité de la photo-polymérisation du collagène cornéen trans-épithéliale assistée par iontophorèse : la quête d'un model expérimental *in vivo*.**

---

#### **Sommaire**

I – Introduction.....	181
II – Matériels et méthodes.....	183
1 - Les animaux : particularités du modèle lapin.....	184
2 - Démographie des lapins.....	187
3 - Anesthésie et euthanasie des lapins.....	187
4 - Enucléation et prélèvements des cornées.....	188
5 - La chambre antérieure artificielle (CAA) pour examen élastographique <i>ex vivo</i> ..	189
6 - Positionnement des lapins pour examen élastographique <i>in vivo</i> .....	190
7 - La sonde d'échographie et son support.....	191
8 - L'image élastographique.....	192
9 - Le matériel de iontophorèse.....	195
a - Principe et historique.....	195
b - Eléments constitutifs du système d'iontophorèse cornéenne.....	196

i - La riboflavine Ricrolin®+ .....	196
ii - L'applicateur pour iontophorèse cornéenne.....	197
iii - Le générateur de courant.....	198
iiii - Le cross-linker émetteur d'UV-A.....	199
10 - Examen à la lampe à fente portable et pachymétrie centrale.....	200
11 - Les analyses histologiques.....	201
a - L'analyse des CXL à J8.....	201
b - Les tests d'innocuité à J8.....	201
12 - Les différents protocoles d'expérimentaux.....	202
a - Le protocole 1 : Tests <i>in vivo</i> avec élastographie <i>in vivo</i> .....	203
b - Le protocole 2 : Tests <i>in vivo</i> avec élastographie <i>ex vivo</i> .....	204
c - Le protocole 3 : Tests d'innocuité <i>in vivo</i> .....	206
III- Résultats.....	208
1 - Evaluations élastographiques <i>in vivo</i> .....	208
a - CXL accéléré (A-CXL), sans épithélium (EPI-OFF).....	208
b - I-CXL (EPI-ON).....	209
2 - Evaluations élastographiques <i>ex vivo</i> .....	115
a - Tests d'inflation.....	215
i - Approche préliminaire.....	215
ii - Application de la procédure pour 6 lapins : courbes pression/élasticité.....	217
iii - Analyse des variations de l'épaisseur cornéenne pendant les expérimentations.....	221
b - Tests d'anisotropie.....	222
i - Choix de la pression d'équilibre.....	222
ii - Preuve de la consommation de riboflavine.....	222

iii - Courbes d'anisotropie.....	223
2- Résultats histologiques.....	226
a - Les deux cornées traitées par C-CXL.....	226
b - Les cornées traitées par I-CXL.....	227
c - Les tests d'innocuité.....	235
IV – Discussion.....	239
1- La transition de l'analyse du CXL <i>in vivo</i> vers l'analyse <i>ex vivo</i> .....	239
2- Effets du I-CXL sur la courbe de pression/élasticité.....	241
3 - Effets du I-CXL sur l'anisotropie cornéenne.....	242
a - Considérations générales.....	242
b - Cartographies d'élasticité.....	242
c - Courbes d'anisotropie.....	242
4 - Limitations de l'étude.....	243
a - Variations de l'épaisseur cornéenne.....	243
b - Contraintes liées à l'élastographe.....	243
c - Contraintes liées à la iontophorèse.....	244
5 - Résultats histologiques.....	248
a - C-CXL.....	248
b - I-CXL.....	248
c - Innocuité.....	250
4 - Réflexion sur le fonctionnement du CXL et perspectives d'amélioration du modèle expérimental.....	250
V – Conclusions du chapitre.....	252
VI – Bibliographie.....	254

## I - Introduction

Comme détaillé au **Chapitre 2**, le CXL est une procédure visant une modification de la biomécanique cornéenne qui semble efficace pour freiner ou stopper la progression des patients atteints de KC.<sup>1</sup> Cependant, le lien entre l'effet biomécanique préjugé, les modifications tissulaires et l'arrêt dans le temps de la maladie est mal défini. L'effet positif du CXL est-il lié : au durcissement physique du tissu ? A un réarrangement architectural et cellulaire secondaire à la cicatrisation ? Aux mesures complémentaires mises en œuvre en parallèle du CXL ? Les réponses ne sont que très partiellement disponibles dans la littérature.

Si toutefois nous considérons le CXL en terme de procédure photochimique, l'effet princeps de polymérisation du collagène cornéen antérieur devrait aboutir à un durcissement de la cornée centrale, au moins temporairement, jusqu'au renouvellement du tissu qui prendrait, à priori, plusieurs années.<sup>2</sup> Le durcissement immédiat du tissu cornéen a bien été mis en évidence *ex vivo*, essentiellement par des tests d'extensométrie. Cependant, en condition *in vivo*, seules deux observations préliminaires (avec de faibles effectifs) furent publiées en 2012 par TM Nguyen (Elastographie SSI) sur modèle porcin, puis en 2013 par BK Armstrong (Elastographie OCT) sur modèle lapin, avec pour ce dernier auteur, un délai post CXL limité à 2 mois de suivi. **Cf. Chapitre 1.** Ainsi, l'essentiel des résultats expérimentaux sur le CXL proviennent d'essais réalisés dans des conditions lointaines des conditions physiologiques, ne prennent pas en compte la cicatrisation et le remodelage cornéen et ne donnant qu'une image semi-quantitative de la réalité du CXL.

En clinique, un outil de mesure *in vivo* permettrait d'affiner le dépistage, le dosage et l'efficacité du CXL. Pour la recherche, il faudrait un modèle vivant robuste pour mieux comprendre les mécanismes vraisemblablement complexes du CXL et mieux cibler les protocoles ensuite transférés aux essais cliniques.

Dans notre série préliminaire de CXL conventionnel (C-CXL) réalisée sur modèle porcin *in vivo*, le retrait de l'épithélium (dont la valeur biomécanique est sans doute négligeable), primordial pour le passage de la riboflavine, représente un problème méthodologique important à cause des variations pachymétriques secondaires qui sont peu contrôlables.<sup>3</sup> Dans le cas de l'imagerie échographique par ultrasons, cette situation est aggravée par l'échange possible de fluides lors des mesures, réalisées en immersion. De plus, nos essais n'avaient pas

pu regarder l'effet du CXL une fois l'épithélium cornéen reconstitué. Les biais de cicatrisation étant par ailleurs importants chez l'animal, invalidant potentiellement cette approche.

L'évaluation fine de l'effet biomécanique du CXL sur modèle animal *in vivo* est donc une tâche complexe d'interprétation. Ainsi, le modèle du CXL trans-épithélial (T-CXL) nous est apparu plus robuste et contributif pour démontrer l'effet biomécanique isolé du CXL avec une approche où la cicatrisation induite après le CXL serait surtout celle du stroma cornéen, sans interaction forte avec le processus de reconstruction épithélial.

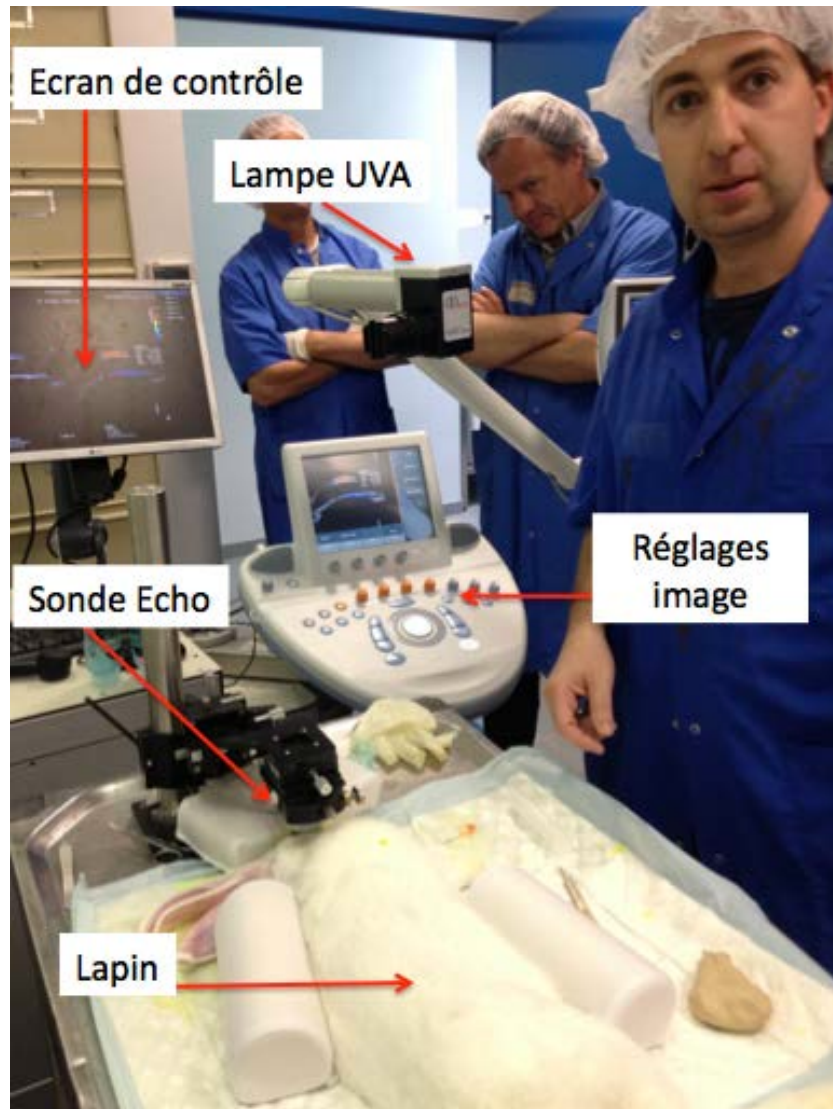
Jusqu'à l'apparition récente de la iontophorèse cornéenne, le concept du T-CXL reposait sur une fragilisation des jonction épithéliales par des composés toxiques dont l'efficacité clinique reste controversée, aboutissant à un passage irrégulier et une interaction cellulaire très limitée au niveau du stroma cornéen antérieur.<sup>4-5</sup> En revanche, les études préliminaires pour le CXL médié par iontophorèse cornéenne (I-CXL) ont démontré des niveaux de passage à travers l'épithélium tout à fait acceptables (environ 50% par rapport au C-CXL) et compatibles avec un CXL secondaire réalisé à travers un épithélium parfaitement sain.<sup>6</sup> L'épithélium arrêtant peu les UV-A et gardant à priori peu la riboflavine, ce dernier ne pouvant pas être considéré comme un obstacle significatif au processus de photo-polymérisation.<sup>7</sup>

Ce chapitre décrit ainsi les dernières avancées expérimentales du projet « MICROELASTO ». Il est ici construit comme un seul article scientifique mais son contenu fait l'objet de la rédaction de plusieurs articles indépendants. Le premier objectif de nos expérimentations était de valider un protocole expérimental sur le modèle lapin pour l'analyse fine de l'effet *in vivo* du T-CXL mesurée par la technologie SSI. Les objectifs secondaires étaient de tester l'efficacité du T-CXL assisté par iontophorèse et de regarder son effet histologique.

## II – Matériels et Méthodes

**Le matériel expérimental** fut installé au sein de l'animalerie de l'unité INSERM 1035, il comportait les éléments suivants (Cf. **Figure 66**) :

Dispositifs médicaux	Matériels de mesure	Consommables
1 Elastographe SSI (Supersonic Imagine – France) avec sonde 15 MHz (Vermon – France)	1 Pachymètre cornéen à ultrasons (CS-100 - Tomey - Japon)	24 Liquides de déturgescence (ThinC - Alchimia - Italie)
1 Système de translation en 4D de la sonde (conception Alphanov - Bordeaux, France)	1 Manomètre (BiosebAZ 8215 - France)	24 Systèmes de Iontophorèse (Iontophor CXL - Sooft - Italie)
1 Cross linker UV-A Vega CBM X-Linker (Sooft - Italie)	1 Lampe à fente portable (Hawk eye - Dioprix - France)	24 Dosettes de riboflavine (Ricrolin+ - Sooft - Italie)
2 Chambres antérieures artificielles (DORC - Pays bas)		



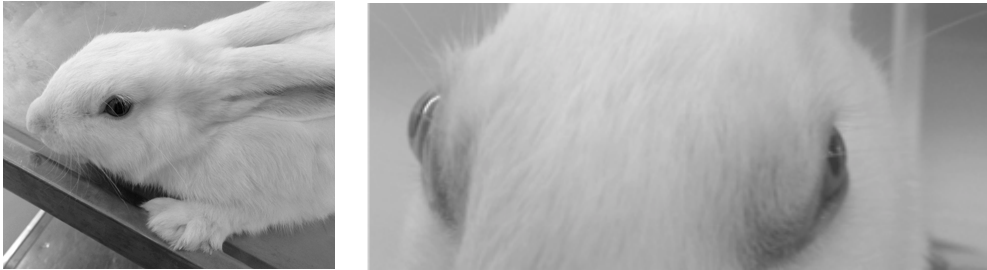
**Figure 66:** Agencement de la salle d'expérimentations.

## 1 - Les animaux : particularités du modèle lapin

Les lapins enrôlés dans l'expérimentation étaient fournis par l'animalerie de l'unité INSERM 1034. Une période d'acclimatation de 7 jours était prévue avant le début de toute expérimentation. Les essais furent pratiqués en accord avec les règles de bonnes pratiques de l'expérimentation animale. 32 lapins de type *New Zealand white albinos*, de sexe masculin ont été successivement étudiés (2,5 à 3,5 kg / 2 à 3 mois de vie). La liste des expérimentations pratiquées est stipulée plus bas dans la section protocoles.

Certains points sur l'anatomie comparative entre le lapin et l'humain sont importants à signaler dès à présent :

- la position des yeux du lapin est très latéralisée et ces derniers se retrouvent en dehors de toute protection osseuse,



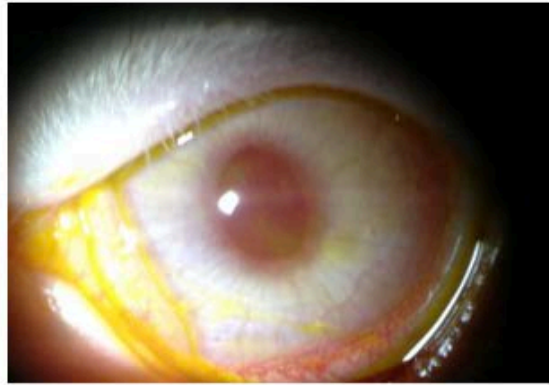
**Figure 67 :** Position latéralisée des globes oculaires, exposition des cornées.

- la cornée est plus bombée que chez l'homme (rayon de courbure =  $7,26 \pm 0,26$  mm),
- la cornée est plus fine que chez l'homme (pachymétrie centrale d'environ 400 microns),
- le diamètre cornéen est plus grand que chez l'homme ( $13 \pm 0,3$  mm),
- le lapin possède une troisième paupière en position nasale qui déborde sur la cornée et peut poser un problème pour certaines manipulations au niveau de la surface oculaire,



**Figure 68 :** Image OCT réalisée sur un des yeux de lapin, après énucléation.





**Figure 69 :** Troisième paupière en position nasale (ici colorée à la Fluorescéine).

- le cristallin occupe une très grosse proportion du volume intra-oculaire,
- d'un point de vue histologique, il n'existe pas de membrane de Bowman individualisable sous l'épithélium, la réticulation du collagène est moins organisée et l'endothélium possède un réel pouvoir de régénération.



**Figure 70 :** Comparaison entre un globe de lapin (à gauche) et d'humain (à droite).<sup>8</sup> La cornée de lapin est très large par rapport à la taille du globe. Werner et al, 2006.

## 2 - Démographie des lapins

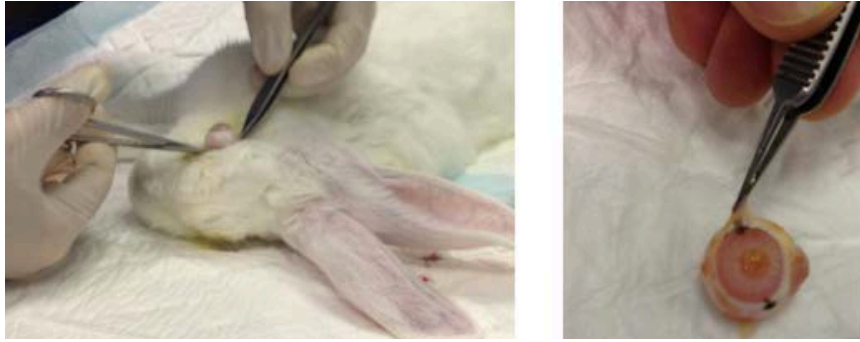
- Une première série de 11 lapins a permis de tester la faisabilité des mesures élastographiques *in vivo* après réalisation de CXL *in vivo*. Les lapins ont été maintenus en vie 7 jours après le CXL et ont bénéficié d'une analyse histologique sur globe entier.
- Une deuxième série de 11 autres lapins a été consacrée à l'analyse *ex vivo* des CXL réalisés *in vivo*. Seules les cornées furent prélevées avec une collerette sclérale minimale de 2 mm pour réalisation, le jour même, des mesures élastographiques sur chambre antérieure artificielle. Nous n'avons pas réalisé d'analyse histologique pour ces cornées.
- Une troisième série de 10 lapins a permis de réaliser des tests d'innocuité. Les lapins ont été maintenus en vie 7 jours après le CXL et ont bénéficié d'une analyse histologique sur globe entier.

## 3 - Anesthésie et euthanasie des lapins

Les lapins étaient anesthésiés par voie intramusculaire avec un mélange 1/4 Kétamine hydrochloride (Virbac – France) and 3/4 Acepromazine (Calmivet – Vétoquinol- France). Pour les protocoles I-CXL, seul l'œil droit était traité et toujours examiné en premier, l'œil gauche servant de témoin, n'était pas traité (sauf pour le lapin N°18). L'euthanasie des lapins survenait après anesthésie intramusculaire puis injection d'une dose létale de Propofol dans la veine marginale de l'oreille.

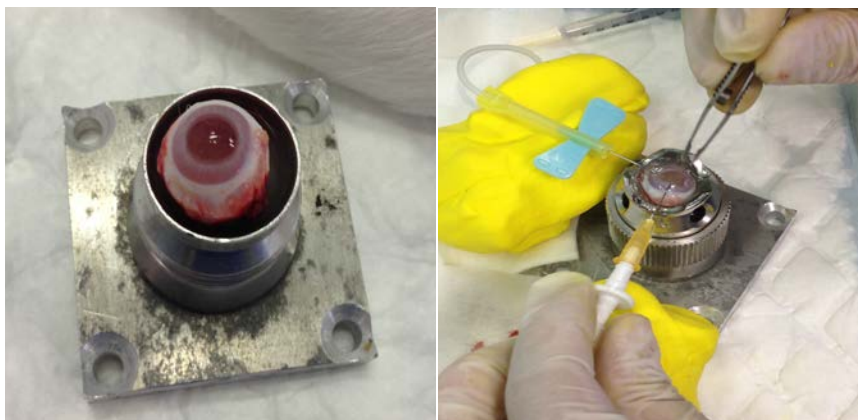
## 4 - Enucléation et prélèvements des cornées

Pour la première série et la troisième série de lapins, l'enucléation fut pratiquée par simple luxation du globe après péritomie conjonctivale limbique sur 360°. La section du nerf optique était pratiquée aux ciseaux courbes. L'axe de coupe histologique désiré était marqué à l'encre de chine au niveau du limbe, par deux points d'encre opposés. Les globes entiers étaient envoyés en anatomopathologie dans du formol pour inclusion, coupes et colorations.



**Figure 71 :** Enucléation et marquage des globes oculaires.

Une tentative de mise en place d'une infusion sur globe entier, dans le segment antérieur fut expérimentée et rapidement abandonnée en raison des difficultés pratiques et de reproductibilité médiocre. Les deux principaux écueils rencontrés furent : l'introduction de petites bulles gaz dans le segment antérieur et le suintement de liquide par les deux points de ponction. La mise en place d'une aiguille par le truchement du nerf optique aurait été une solution utile si nous n'avions pas eu besoin de mesurer et faire fluctuer finement la pression intra oculaire.



**Figure 72 :** Tentative de montage d'infusion dans le segment antérieur d'un œil énucléé.

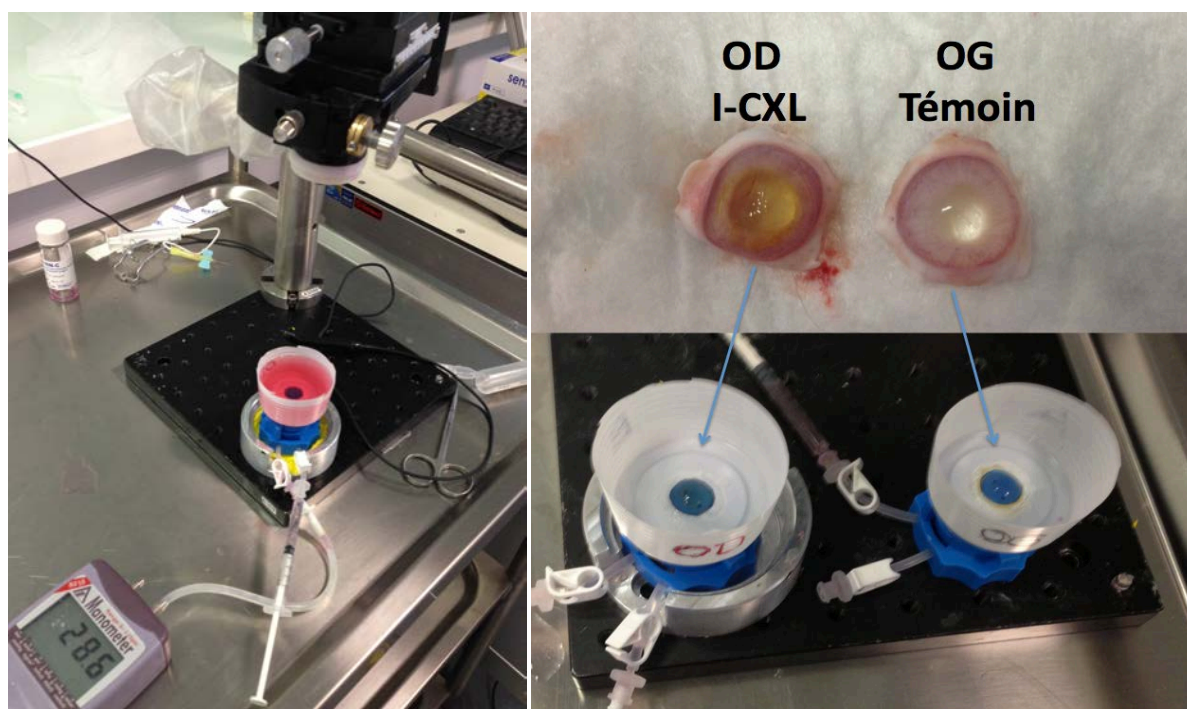
La deuxième série de lapins ne fut pas énucléée mais le prélèvement des cornées fut pratiqué, après péritomie conjonctivale, par incision trans-sclérale à environ 2-3 mm du limbe puis par découpe aux ciseaux courbes de proche en proche sur 360°. La partie supérieure de la cornée était marquée au limbe par un point d'encre afin de respecter le positionnement de la cornée sur la CAA.



**Figure 73 :** Cornée découpée à 2 mm du limbe.

## 5 - La chambre antérieure artificielle (CAA) pour examen élastographique *ex vivo*

Les cornées furent découpées avec une collerette continue d'au moins 2 mm afin de pouvoir se fixer dans un dispositif chirurgical de CAA, utilisé pour la trépanation des greffons dans le cadre des greffes de cornées (DORC; Pays bas). Le cœur de la CAA est hermétique et doit être maintenue en phase aqueuse de manière à ne pas entraver la propagation des ondes échographiques. Les bulles d'air sont totalement prosrites car limiteraient considérablement la qualité de l'image. Le liquide utilisé fut le liquide de déturgescence, également utilisé pour remplir le bac d'immersion de la sonde d'échographie (ThinC- Alchimia – Italie). La cornée restait ainsi baignée par ces deux faces perméables dans le liquide d'immersion. Le bac en question était en fait le fond d'un gobelet en plastique artisanalement collé sur la CAA, percé par un orifice en son fond de manière à exposer totalement la cornée dans le liquide d'immersion. La cornée se retrouvant ainsi en regard de la sonde dont la focale était d'environ 8 mm (champ latéral de 12,8 mm). La clarté du bain et l'absence de bulle de gaz furent là aussi des conditions nécessaires. Il existait deux entrées avec tubulures et claps communiquant avec le cœur dans la CAA. Une entrée était mise en continuité avec le manomètre (BiosebAZ 8215 – France), l'autre avec une seringue contenant du liquide d'immersion. Le dispositif permettait ainsi de mesurer simplement et précisément en même temps la pression dans le cœur de la CAA, simulant, *in vitro*, les variations de la pression intra oculaire. Néanmoins, dans ce montage, le tissu cornéen était comprimé au niveau de la collerette afin d'assurer l'étanchéité et le cœur en arrière du greffon était constitué en plastique indéformable. Il y avait donc des limitations fortes à la propagation des ondes mécaniques en dehors du greffon (conditions aux limites). La moindre variation de pression d'infusion était donc obligatoirement plus fortement ressentie par le tissu qu'en situation physiologique, ou lors d'une expérimentation d'infusion sur globe entier.

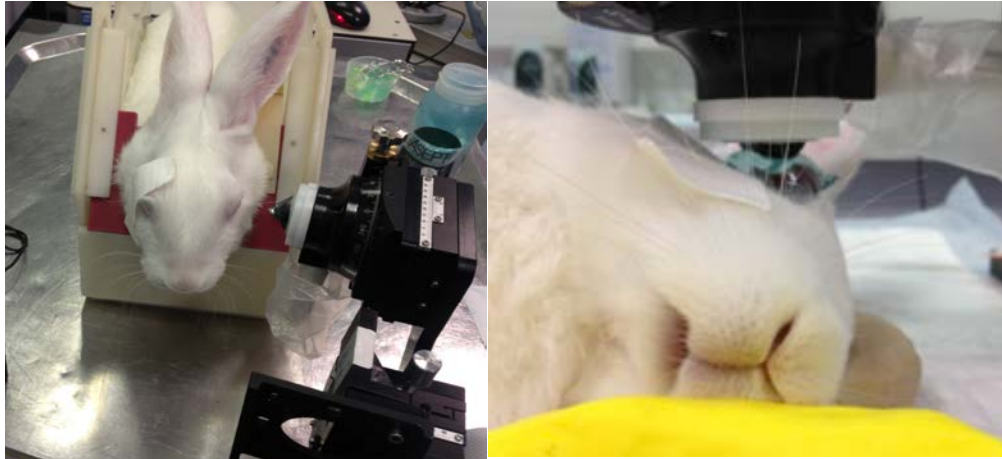


**Figure 74** : Positionnement de la sonde d'élastographie à la verticale de la CAA avec l'exemple, à droite, de deux cornées issues d'un même lapin après procédure unilatérale de I-CXL.

## 6 - Positionnement des lapins pour examen élastographique *in vivo*

L'anatomie des lapins et leur cinétique respiratoire nous ont contraint à examiner les cornées avec les lapins positionnés sur le flanc. Des essais ont été entrepris en laissant le lapin endormi dans une position verticale mais ce dernier ne respirait plus correctement. Nous n'avons pas pu contourner le problème de la compression de l'œil controlatéral pendant l'examen du premier œil dans notre série de manipulations. Ainsi, notre sonde échographique arrivait naturellement à la verticale de l'œil, en immersion dans du gel échographique délicatement déposé dans la fente palpébrale pour éviter le piégeage de bulles, délétères à l'imagerie échographique.





**Figure 75 :** Tentative infructueuse de verticalisation des lapins (gauche) ; position de référence pour l'élastographie des cornées *in vivo* (droite).

La méthode d'ouverture des paupières fut un obstacle important dans notre expérimentation. La pose d'un écarteur rigide induisant une bonne ouverture de la fente palpébrale mais entraînait une compression des globes oculaires délétère pour nos mesures. Ce point sera détaillé dans la session des résultats. La traction par des adhésifs collés sur les poils du lapin nous a rapidement paru être une solution plus « biomécaniquement neutre ».

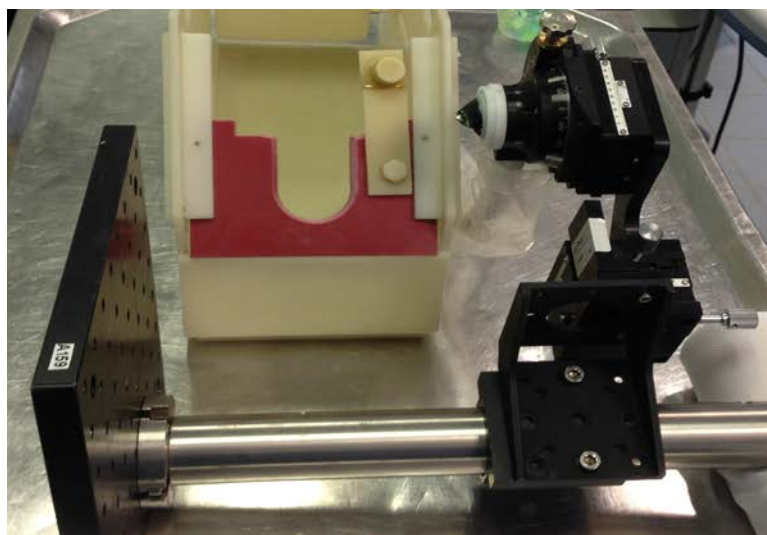


**Figure 76 :** Utilisation d'adhésif à gauche et d'un écarteur rigide à droite (la sonde est ici susceptible d'appuyer sur l'écarteur) pour obtenir une bonne exposition de la cornée des lapins endormis.

## 7 - La sonde d'échographie et son support

La sonde échographique avait été spécialement dessinée pour les besoins de l'application ophtalmologique. Elle est constituée d'une barrette de 128 éléments aux dimensions proches du diamètre cornéen (2 mm). Un support à 4 degrés de liberté micrométrique (x-y-z-Rotation)

avait été conçu d'après un cahier des charges compatible avec les contraintes de l'examen ophtalmologique à la lampe à fente. Le détail de la conception est explicité plus loin dans la section application à l'humain (**Cf. Chapitre 5**). En pratique, le bloc sonde était verticalisé au dessus de la cornée et était monté sur un bras à coulisse permettant un ajustement macroscopique.



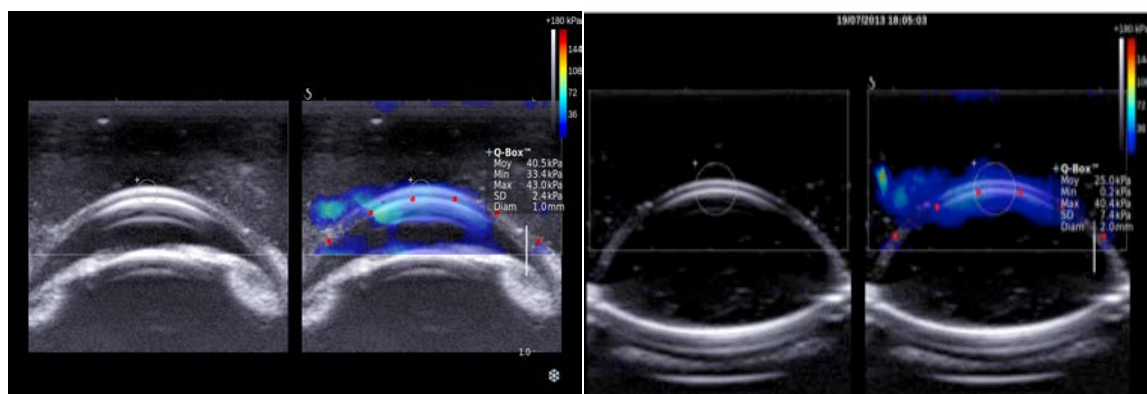
**Figure 77:** Sonde échographique sur son bras articulé (photo en position allongé).

## 8 - L'image élastographique

L'interface du logiciel de l'élastographe Explorer (Supersonic Imagine – France) permet un affichage en temps réel de l'image échographique en mode bidimensionnel (B) avec ou non la superposition de la carte d'élasticité en couleur (rafraichissement de l'image à la cadence d'une fois par seconde). Le logiciel avait été adapté aux besoins de l'imagerie de la cornée en permettant de visualiser la ligne de focalisation des 6 points de tirs que réalisait en permanence l'élastographe pour moyenner l'image élastographique. L'échelle était affichable en kPa ou en m/seconde. Les bornes de l'échelle colorimétrique étaient ajustables (couleurs chaudes = élasticité plus forte).

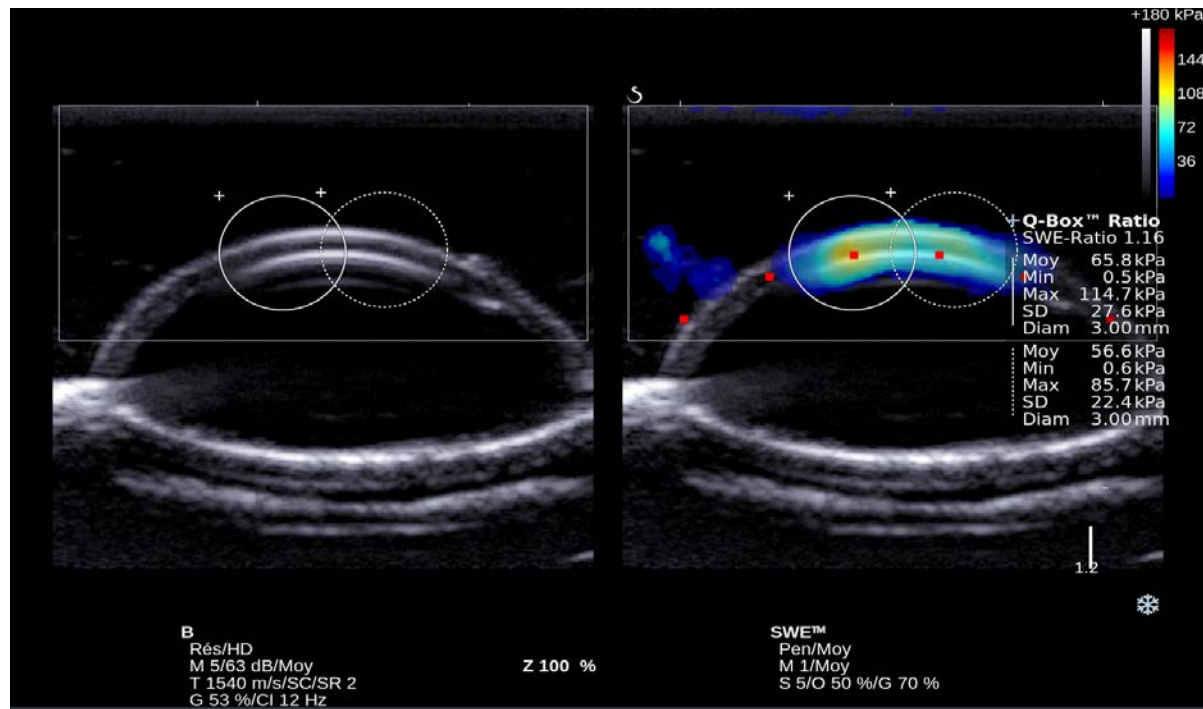
Le protocole d'acquisition des images était le suivant :

- Création d'un dossier lapin et passage en mode mesure,
- Positionnement de la sonde en regard de la cornée puis déclenchement du B-mode pour obtenir l'image échographique,
- Ajustement de la position optimale de la sonde par le biais des 3 platines micrométriques, les échos devaient être maximums au niveau de l'apex cornéen,
- Vérification de l'absence de bulles parasites (dans gel échographique ou dans le milieu d'immersion),
- Vérification de l'absence de contrainte mécanique entre la sonde et la tête de l'animal,
- La focale échographique était ajustée au niveau de la cornée (contrôle logiciel),
- La modalité du tir était choisie parmi: normal, pénétration ou résistance. Le mode pénétration fut systématiquement choisi car donnait le plus large champ d'analyse en mode élastographique,
- Le mode d'affichage à l'écran était sélectionné: B-mode à gauche de l'écran, SWE-mode à droite de l'écran, **Cf. Figure 78.**
- Le mode « shear wave elasto (SWE) » était activé et il fallait attendre environ 10 secondes pour voir se stabiliser la carte de dureté,
- Possibilité de réaliser des captures d'écran et des séquences vidéo en SWE-mode,
- Fin de l'examen, les données étaient automatiquement mémorisées: les images pouvaient être ensuite retravaillées pour effectuer des mesures biométriques ou élastométriques (outil Qbox). **Cf. Figure 79.**



**Figure 78** : Illustration de l'image obtenue en B-mode à gauche, superposée avec le SWE-mode à droite. Cas du globe entier (*in vivo*) à gauche et cas de la cornée montée sur CAA (*ex vivo*) à droite.





**Figure 79** : Illustration de la mesure par la fonction Qbox de la dureté moyenne contenue dans un cercle de diamètre choisi (ici deux cercles de diamètre 3 mm posés à cheval sur la cornée).

Pour achever le traitement des données, il conviendrait de réaliser un masque pour exclure le signal parasite situé en dehors de la cornée et de réaliser une convolution mathématique pour décambrier celle-ci et l'enrichir des données obtenues par les films de propagation des ondes de cisaillement. Ce post traitement des données n'a pas été réalisé dans notre travail sur les lapins car il s'est avéré assez difficile d'obtenir de bonnes convolutions en dehors des 4-6 mm centraux de la cornée. Compte tenu de la faible courbure de la cornée dans ce périmètre, ces ajustements n'ont pas été entrepris car jugés peu contributifs.

## 9 - Le matériel de iontophorèse

### a - Principe et historique

Le principe de la iontophorèse est de permettre le passage de molécules chargées électriquement à travers une barrière épithéliale naturellement peu perméable grâce à l'application d'un champ électrique constant. L'iontophorèse (ou transfection ionique) cornéenne est une technique d'administration de médicaments dont le principe repose sur une pénétration trans-cornéenne de molécules ionisées sous l'effet d'un faible courant électrique (Loi de Coulomb - 1780).

L'iontophorèse a été utilisée en ophtalmologie par voie trans-conjonctivale, trans-cornéenne ou trans-sclérale. Cependant, les mécanismes précis de passage des produits pharmacologiques sont assez bien décrits grâce aux travaux effectués en dermatologie.<sup>9</sup> Du fait de la spécificité de chaque tissu, les dispositifs de iontophorèse et les paramètres de traitement associés (densité de courant, durée d'application, composition de la solution) doivent être adaptés.

La première application oculaire de l'iontophorèse a été rapportée dans un modèle expérimental animal en 1943 par von Sallman.<sup>10</sup> Pendant les décennies suivantes, la recherche sur l'iontophorèse a progressé.<sup>11-12</sup> En 1989, Lam et al ont montré que la concentration de dexaméthasone vitréenne délivrée par iontophorèse était 3500 fois supérieure à celle délivrée par collyre et 700 fois supérieure à celle délivrée en injection sous-conjonctivale.<sup>13</sup> Quand les limites électriques de tolérance sont respectées et contrôlées, la iontophorèse est bien tolérée et dénuée d'effets tissulaires indésirables.<sup>14-17</sup> Yoo et al ont confirmé l'innocuité de la iontophorèse dans des conditions d'utilisation conformes.<sup>18</sup> Parkinson et al, ont confirmé l'innocuité chez les sujets humains pour des courants électriques jusqu'à 3 mA pendant 20 minutes.<sup>19</sup> La iontophorèse peut aussi prolonger la durée d'action du traitement, comme démontré dans une étude comparant la iontophorèse à l'instillation de collyres.<sup>20</sup> Des études expérimentales ont enfin montré que l'iontophorèse d'hémisuccinate de méthylprednisolone sodique (Solumédrol®) permet l'obtention de concentrations élevées de corticoïdes dans les segments antérieurs et postérieurs du globe oculaire avec un très faible passage systémique.<sup>21</sup>

La iontophorèse est ainsi utilisée depuis plusieurs dizaines d'années ophtalmologie, de façon assez marginale, pour le traitement des infections bactériennes ou virales cornéennes profondes ou pour transférer des produits qui ne franchissent pas la barrière cornéenne.<sup>22-24</sup>

#### **b - Eléments constitutifs du système d'iontophorèse cornéenne**

Les particularités de l'iontophorèse oculaire reposent sur l'utilisation d'une électrode au contact de la surface oculaire. Un système d'iontophorèse est muni d'un générateur équipé d'un microprocesseur programmable, générant un courant électrique constant de faible intensité (quelques milliampères) et calibré. L'électrode active oculaire, à usage unique, est composée de 2 parties : l'une contenant l'électrode métallique et l'autre, une jupe en silicone souple aux bords mous qui vient s'apposer sur la conjonctive, assurant la stabilité de l'électrode et empêchant tout risque de contact entre l'électrode métallique et les tissus oculaires. L'électrode passive est collée sur la peau du front.

#### **i - La riboflavine Ricrolin®+ (SOOFT - Italie)**

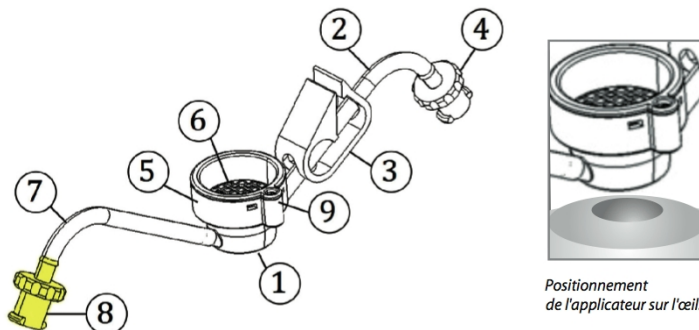
Le produit administré est une solution de riboflavine (0,1%) spécialement formulée pour la iontophorèse cornéenne. 1 ml de produit est conditionné dans un flacon verre avec septum, il faut se munir d'une seringue avec aiguille pour prélever la quantité de produit nécessaire au traitement (0,45 ml minimum) et injecter la solution dans le réservoir de l'applicateur cornéen. Sa composition est la suivante:

<b>Pour 100 ml</b>	<b>Valeurs</b>
Riboflavine Phosphate disodique % (pour 0,1% de riboflavine base)	0,147
EDTA sodique %	0,1
Trometamine %	0,05
Eau distillée	QSP 100 ml
Osmolarité (mOsmol/l)	96
pH	7,0
Stérilisation par filtration	Oui

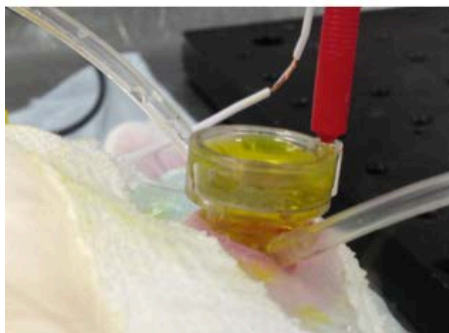
## ii - L'applicateur pour iontophorèse cornéenne: Iontofofor-CXL® (SOOFT – Italie)

L'applicateur pour iontophorèse cornéenne (Cf. **Figures 80-81**) se compose de :

- Un anneau de succion (1) qui permet de fixer le dispositif sur la cornée pendant l'intervention.
- Un tube (2) servant à aspirer l'air, et pouvant être fermé à l'aide d'un clamp (3).
- Un connecteur luer-lock femelle (4), servant à relier la seringue d'aspiration à l'applicateur (voir liste des accessoires à usage unique).
- Un réservoir (5) à remplir avec du RICROLIN®+. La surface d'application de 0,64 cm<sup>2</sup> (diamètre 9 mm) permet une densité de courant de 1,5mA/cm<sup>2</sup>, soit 13 fois moins que la densité maximale tolérée par la cornée.
- Une électrode grillagée (6), située dans la partie supérieure du réservoir (5), qui transmet le courant à la solution de RICROLIN®+.
- Un autre tube (7) avec un connecteur luer-lock femelle de couleur jaune (8), servant à remplir et vider le réservoir (5) de RICROLIN®+.
- Un connecteur électrique (9) pour le branchement du générateur de courant I-ON CXL® (voir liste des accessoires réutilisables).



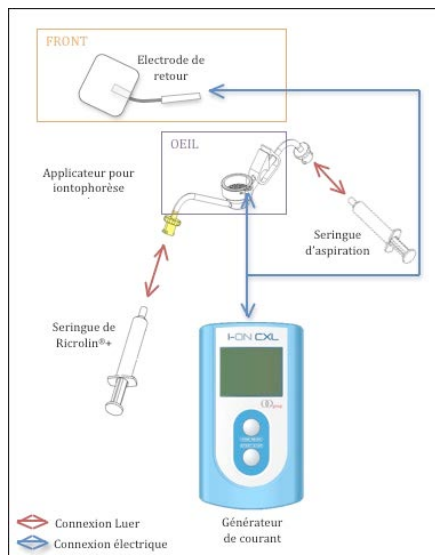
**Figure 80 :** Détail des composants de l'applicateur pour la iontophorèse.



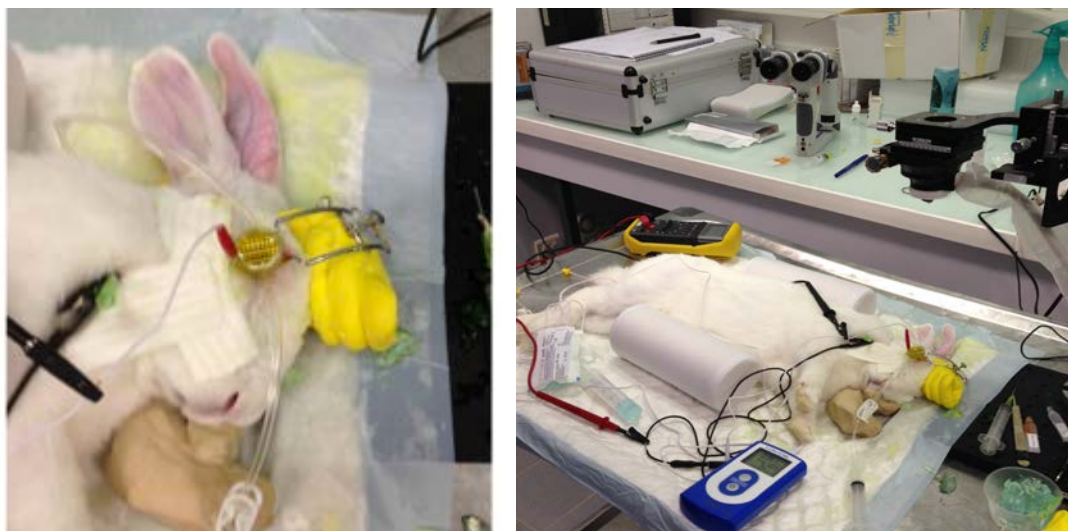
**Figure 81 :** Montage de l'applicateur sur la cornée des lapins.

### iii - Le générateur de courant: I-on CXL® (SOOFT Italie), dispositif classe IIb.

Il s'agit d'un générateur équipé d'un microprocesseur programmé permettant la création d'un champ électrique variable en fonction de la variation des résistances tissulaires et permettant ainsi le maintien d'un courant constant. La quantité de charge délivrée est contrôlée en permanence et présélectionnée par le praticien (nominal à 1 mA pouvant être baissé à 0,5 mA en cours de traitement pour les patients sensibles). Un système d'alarme signale toute interruption dans le passage du courant, dans le cas où l'appareil ne peut plus fournir l'ampérage demandé. Si le traitement est interrompu en cours de route, le générateur calcule automatiquement la dose de courant restant à délivrer et peut reprendre le traitement stoppé en garantissant une dose totale de 5 mA/min. Le générateur est calibré afin de ne pouvoir en aucun cas délivrer un courant d'intensité supérieure à 1 mA. Un interrupteur permet la mise sous tension du générateur. La source électrique du générateur est une pile de 9 volts. L'écran d'affichage signale si la batterie est trop faible pour réaliser un traitement. Il donne également une indication de la résistance électrique (circuit et patient) et le temps de traitement restant. Une électrode cutanée de retour (PROTENS ELITE 4848LE - Bioprotech Inc) est connectée au générateur par un connecteur de type Jack 2 mm femelle, une fois dénudée. La partie dénudée est utilisée pour fermer le circuit électrique via une petite pince crocodile connectée à une aiguille en métal sous la peau du cou du lapin pour permettre au circuit de fonctionner.



**Figure 82 :** Circuit électrique de la iontophorèse.



**Figure 83 :** Mise en place de la iontophorèse sur l'œil du lapin, électrode de retour dans le cou.

### iii - Le cross linker émetteur d'UV-A (CBM X linker - SOOFT Italia, classe IIa)

L'appareil de cross-linking fut le modèle de SOOFT Italia, utilisé en clinique pour le CXL accéléré (A-CXL), préconisé par le fabricant pour le protocole assisté par iontophorèse. L'appareil émetteur d'UV-A est spécialement conçu pour délivrer une dose d'UV-A (370 nm) de  $5,4 \text{ J.cm}^2$ . Les UV-A sont émis par des diodes. Ce dispositif est équipé d'un photomètre permettant de vérifier l'intensité des UV-A, soit  $10 \text{ mW/cm}^2$ , appliquée pendant 9 min sur une surface de  $0,50 \text{ cm}^2$  (faisceau de 8 mm de diamètre), soit 2,7 J délivrés sur la cornée. L'appareil est équipé d'un écran permettant de visualiser la cornée en cours de traitement et de vérifier le bon centrage du faisceau.

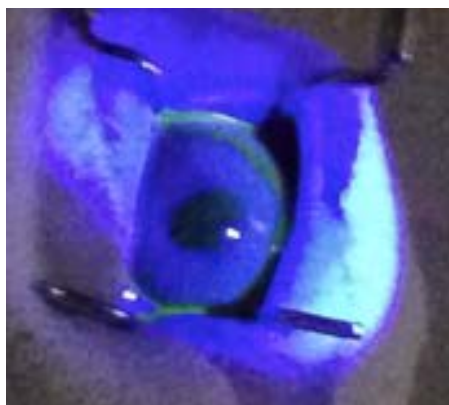


**Figure 84:** CBM X-linker et de l'image obtenue par sa caméra.

## 10 - Examen à la lampe à fente portable et pachymétrie centrale

L'examen des cornées a été nécessaire à différents stades pour démontrer l'absence de variation significative de l'épaisseur cornéenne et l'intégrité épithéliale aux différents temps des expérimentations. A noter que l'examen à la lampe à fente après iontophorèse pour dépister d'éventuelles anomalies épithéliales se heurte à une compétition entre la riboflavine et la Fluorescéine pour l'absorption de la lumière bleue de la lampe à fente et pour l'émission de lumière verte par désexcitation radiative. Cependant, l'absorption plus forte des photons bleus par la Fluorescéine (facteur 10) et la disparité entre une émission diffuse pour la riboflavine et uniquement localisée pour la Fluorescéine permettait un bon contraste pour la visualisation d'éventuelles lésions de la surface cornéenne. Les cornées étaient rincées avec une solution isotonique (BSS ®) pour évacuer les résidus de riboflavine et de Fluorescéine avant chaque nouvelle étape.

Examens pratiqués	Avant iontophorèse	Après iontophorèse	Après UVA	Après Montage sur CAA	Après la fin des acquisitions SSI
Pachymétrie central US (CS 100 – Tomey)	X	X	X	X	X
LAF avec Fluorescéine (Hawk-eye - Dioprix)	X	X	X		



**Figure 85 :** Examen à la LAF après instillation de Fluorescéine, post iontophorèse (absence d'ulcération visible, kératite ponctuée superficielle possible), en lumière bleue.

## - L'outil statistique

Le test d'ANOVA (*one-way variance*) fut appliqué pour évaluer les différences statistiques entre les yeux traités et leurs témoins. Ce test donne la probabilité (p) qu'ont plusieurs échantillons d'avoir la même signification (hypothèse nulle). Ainsi, plus p est petit, plus l'hypothèse nulle est rejetée. Ici, le seuil de significativité pour que les groupes traités et non traités fussent différents fut choisi pour  $p < 0,05$ . Le logiciel "Statplus" fut utilisé pour les calculs (Microsoft Excel®2008).

## 11 - Les analyses histologiques

**a - L'analyse des CXL à J8** fut obtenue sur globe entier fixé en méthode conventionnelle.

Juste après euthanasie, les cornées furent transportées le jour même dans le formol pour prise en charge au laboratoire d'anatomopathologie. Les cornées furent incluses dans la paraffine et découpées selon l'axe central de la cornée. Une coloration HES et un marquage au CD34 (marqueur membranaire des kératocytes) furent pratiqués. Le montage et la prise des clichés photographique des coupes furent réalisés sous l'égide du Dr François Léger.

**b- Les tests d'innocuité à J8** furent obtenus sur globe entier fixé en méthode conventionnelle. Juste après euthanasie, les globes furent transportés le jour même dans le formol pour prise en charge au laboratoire d'anatomopathologie. Les cristallins furent séparés du reste du globe pour permettre des coupes de qualité. Tous les échantillons furent inclus dans la paraffine et découpées selon l'axe central de la cornée, en passant par l'axe du nerf optique. Une coloration HES fut pratiquée pour l'analyse comparative. Le montage et la prise des clichés photographiques des coupes furent réalisés sous l'égide du Dr François Léger. Ce dernier réalisa aussi l'analyse comparative des deux yeux de chaque lapin. Seul l'opérateur de l'examen élastographique par SSI, ayant traité au hasard un seul des deux yeux 8 jours avant l'énucléation, connaissait le côté traité et le côté témoin. Le préleveur des cornées et l'examineur des coupes furent différents de l'opérateur du CXL et ne connaissaient pas le côté ayant été examiné par élastographie (Cf. détail des protocoles plus bas). La question suivante était posée au Dr François Léger : « **Existe-t-il des différences histologiques significatives entre les deux yeux d'un même lapin ?** ». Le rapport écrit correspondant fut ensuite mis en confrontation avec la connaissance des côtés effectivement examinés par l'opérateur de l'élastographie.



## 12 - Les différents protocoles d'expérimentaux

Le tableau ci dessous résume les expérimentations menées sur nos 32 lapins :

N° Lapins	Application Riboflavine	Durée UVA à 10 mW/cm <sup>2</sup> (min)	Délai entre examen et sacrifice (jours)
1	Décès à l'induction	-	-
2	C-CXL	9	7
3	C-CXL	9	7
4	I-CXL	9	7
5	I-CXL	9	7
6	I-CXL	9	7
7	I-CXLx2	9	7
8	I-CXLx2	9x2	7
9	I-CXLx2	9	7
10	I-CXLx2 sectoriel	9	7
11	I-CXLx3	9x2	7
12	I-CXLx2	9	0 - Test PIO
13	I-CXLx2	9	0 - Test PIO
14	I-CXLx2	9	0 - Test PIO
15	I-CXLx2	9	0 - Test PIO
16	I-CXLx2	9	0 - Test PIO
17	I-CXLx2	9	0 - Test PIO
18	I-CXLx2 sectoriel	9	0 - anisotropie ODG
19	I-CXLx2 sectoriel	9	0 - anisotropie
20	I-CXLx2 sectoriel	9	0 - anisotropie
21	I-CXLx2 sectoriel	9	0 - anisotropie
22	I-CXLx2 sectoriel	9	0 - anisotropie
23 à 32	-	-	7 - Innocuité

**Tableau récapitulatif :** Résumé des protocoles réalisés pour chaque lapin. Le code de couleurs correspond aux trois catégories de tests (cf. plus bas dans le texte). La mention x2 signifie que le temps ou la dose a été doublée ; x3, triplé.

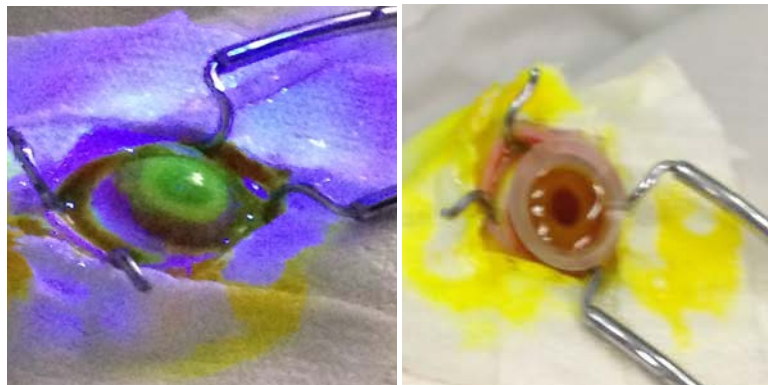
On peut ainsi distinguer trois catégories d'expérimentations qui feront l'objet de trois sessions de résultats et de discussions:

1. Tests *in vivo* avec SSI *in vivo*, sacrifice à J7 et analyse histologique (en noir)
2. Tests *in vivo* avec SSI *ex vivo*, sacrifice immédiat, sans histologie (en rouge et vert)
3. Tests d'innocuité *in vivo*, sacrifice à J7 et analyse histologique (en bleu)

Dans tous les cas de figure, pour les lapins de 1 à 22, sauf pour le lapin 18 qui reçut un CXL bilatéral, les yeux droit furent choisis pour être traités par CXL et examinés en premier, l'œil controlatéral servant de témoin non traité.

**a - Le protocole 1 :** Tests *in vivo* avec élastographie *in vivo*, sacrifice à J7 et analyse histologique.

L'objectif était de tenter de mesurer *in vivo* les variations d'élasticité de la cornée par SSI à J0 et J7 post CXL. Notre premier lapin est décédé à l'induction de l'anesthésie en raison d'un probable surdosage. Les deux lapins suivants ont bénéficié du protocole A-CXL avec ablation de l'épithélium afin de voir si il était possible de prévoir un groupe C-CXL malgré les aléas de la cicatrisation épithéliale. Dans ce protocole, l'épithélium est retiré à l'aide de l'application d'une solution d'alcool diluée à 20% apposée en surface pendant 30 secondes. L'épithélium est ensuite gratté avec une spatule mousse. Un contrôle de la des épithélialisation est réalisé à la LAF avec le test à la Fluorescéine. **Cf. Figure 163.** Une cupule en silicone sert ensuite d'applicateur pour la riboflavine laissée en place 20 minutes. Secondairement un CXL accéléré de 9 minutes à  $10 \text{ mW/cm}^2$  est réalisé. La cornée cicatrise en quelques jours sous protection d'une pommade antibiotique. Les animaux sont réexaminés 7 jours après le traitement.



**Figure 86 :** Desépithélialisation avec test à la Fluorescéine montrant une large ulcération (gauche) et imprégnation de la riboflavine avec l'aide d'une cupule en silicone (droite).

Les huit lapins suivant ont bénéficié d'un I-CXL avec des durées de iontophorèses et d'UVA variables (Cf. Tableau). Cette série de lapins a surtout servi pour l'analyse histologique et pour l'invalidation de la faisabilité pratique de l'examen *in vivo* de l'effet du CXL par SSI.

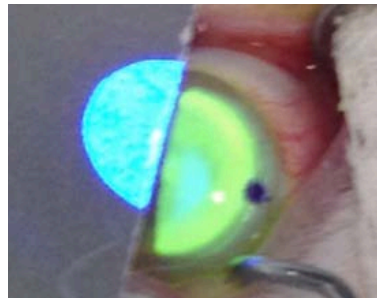
**b - Le protocole 2 :** Tests *in vivo* avec élastographie *ex vivo*, sacrifice immédiat, sans histologie.

Les lapins enrôlés dans l'étude ont bénéficié des conditions de contrôle optimales en terme de contrôle de la pachymétrie, de l'hydratation, du mouvement et de la mise en tension des cornées traitées par rapport à leur cornée contrôle respective. Deux approches distinctes furent évaluées :

Dans les deux cas :

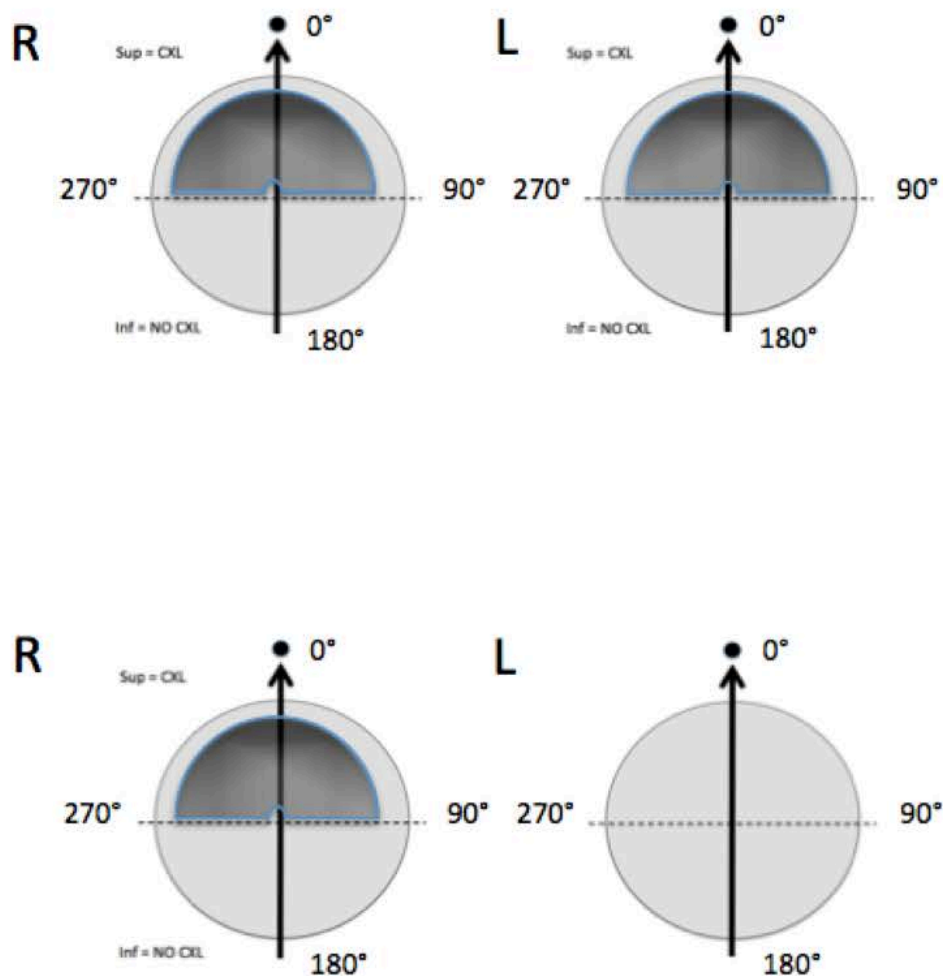
- Les cornées sont isolées des lapins tout juste euthanasiés pour être montées sur deux CAA (une par œil).
  - Le liquide de perfusion et d'immersion est le liquide de déturgescence ThinC. La pression d'inflation de la cornée est réglée finement par un manomètre et une seringue avec clamp.
  - La pachymétrie centrale est mesurée avant et après les mesures d'élasticité.
  - Un premier test de montée en pression est pratiqué pour dépister d'éventuelles fuites sur le montage.
- Mesures de la courbe d'élasticité en fonction de la pression exercée par inflation à la face postérieure de la cornée (équivalent de la pression intra oculaire).
- La cartographie d'élasticité est mesurée pour une mise en charge de la cornée s'étalant de 15 à 50 mm de mercure (mmHg) par incrément de 5 mmHg.
  - La valeur moyenne de l'élasticité de la cornée est secondairement calculée pour chaque valeur d'inflation grâce à l'outil Qbox, positionné sur les 3 mm centraux de la cornée.
  - Les valeurs de l'œil traité sont comparées avec celles de l'œil témoin pour chaque niveau de pression. Une courbe élasticité/inflation est tracée pour les 6 lapins. Les pentes des équations de régressions linéaires sont comparées sur un histogramme et de manière statistique.

- Mesure de l'anisotropie élastique obtenue après I-CXL sectoriel *in vivo*. L'hémi-cornée inférieure des lapins était masquée pendant les UVA de manière à ne traiter que l'hémi-cornée supérieure.



**Figure 87 :** Masquage de l'hémi-cornée inférieure pour le I-CXL sectoriel supérieur.

Ce traitement a été dispensé aux deux yeux pour un lapin (18) et uniquement à l'œil droit pour 4 autres (19 à 22), comme figuré ci-dessous :



**Figure 88 :** Illustration des protocoles de I-CXL sectoriels.

- La cartographie d'élasticité est mesurée pour une mise en charge de la cornée à 25 mm de mercure (mmHg), contrôlée à chaque mesure. La sonde est en premier lieu centrée sur l'apex cornéen et est orientée dans l'axe du repère limbique indiquant le haut de la cornée (hémi-cornée traitée). La sonde réalise ensuite des acquisitions successives tous les 20° d'angle en tournant la bague du système dans le sens horaire, sur 360° (soit 18 coupes).
- La valeur moyenne de l'élasticité de la cornée est secondairement calculée pour chaque axe grâce à l'outil Qbox, positionné sur les 5 mm centraux de la cornée (deux cercles contigus de 3 mm avec chevauchement d'1 mm).
- Les valeurs de l'œil traité sont comparées avec celles de l'œil témoin. Une courbe d'anisotropie élastique (élasticité versus axe d'observation) est tracée pour les 5 lapins. Le lapin n° 18 ayant bénéficié du même traitement aux deux yeux. Les valeurs sont comparées de manière statistique.

### **c - Le protocole 3 : Tests d'innocuité *in vivo*, sacrifice à J7 et analyse histologique**

La palpation échographique induit une dispersion d'énergie mécanique nécessaire pour engendrer une onde de cisaillement d'amplitude suffisante pour parcourir une partie de la cornée. L'énergie déposée dans le globe oculaire est réglementée par des normes échographiques très strictes et précises. Afin de passer un jour de l'expérimentation animale à l'essai sur l'humain, le dossier de marquage CE ou FDA nécessitera des preuves tangibles d'innocuité aux niveaux d'énergie maximum utilisables. L'objectif pour les 10 lapins enrôlés dans ce protocole était de démontrer qu'avec les pressions de radiations utilisées il n'y ait pas de risque tissulaire pour les différentes structures du globe oculaire. Afin de permettre de mettre en évidence des réactions biologiques retardées, l'euthanasie pour analyse histologique fut réalisée 7 jours après l'exposition aux ondes élastographiques.

- Un seul œil du lapin, tiré au sort, était examiné par la sonde SSI pendant 20 minutes de tirs élastographiques continus,
- l'œil controlatéral servant de témoin,
- le préleveur des globes fut différent de l'examineur des cornées par élastographie. Il ne fut pas informé du côté observé 7 jours auparavant.

- L'analyse histologique fut elle aussi réalisée en insu, l'anatomopathologiste disposant d'une dizaine de paires d'yeux dont le côté examiné par l'élastographe n'était pas mentionné.
- La coupe passait par le méridien cornéen marqué et observé (axe de la fente palpébrale). Le cristallin était dissocié au moment de la coupe.
- L'anatomopathologiste fournissait une description comparative des coupes histologiques entre les deux yeux.

En pratique, chaque globe oculaire fut fixé 48 heures dans le formol tamponné et fit l'objet de 2 prélèvements :

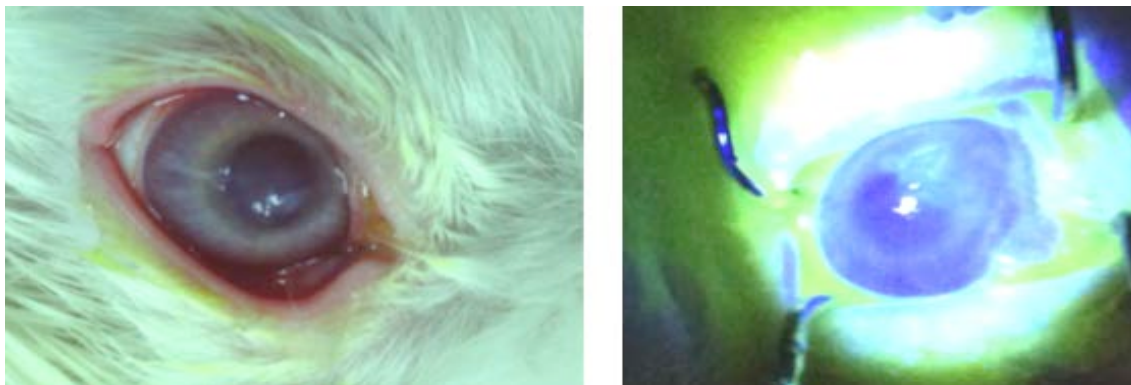
- Une coupe sagittale médiane perpendiculaire à une ligne matérialisée par 2 points marqués au niveau de la conjonctive limbique par feutre noir diamétralement opposés passant par l'axe optique et permettant d'étudier la cornée et la rétine,
- Une coupe équatoriale du cristallin (lieu de l'activité cellulaire),
- Chaque prélèvement inclus en paraffine fit l'objet d'une coupe de 3  $\mu$ m suivie d'une coloration standard hématoxyline éosine safran et microphotographies photographiées aux grossissements x10, x 20, x 40,
- Mesures particulières effectuées : épaisseur de la cornée de chaque cas et calcul du nombre de mitoses présentes au niveau de l'épithélium cornéen d'une extrémité limbique à l'autre.

### III - RESULTATS

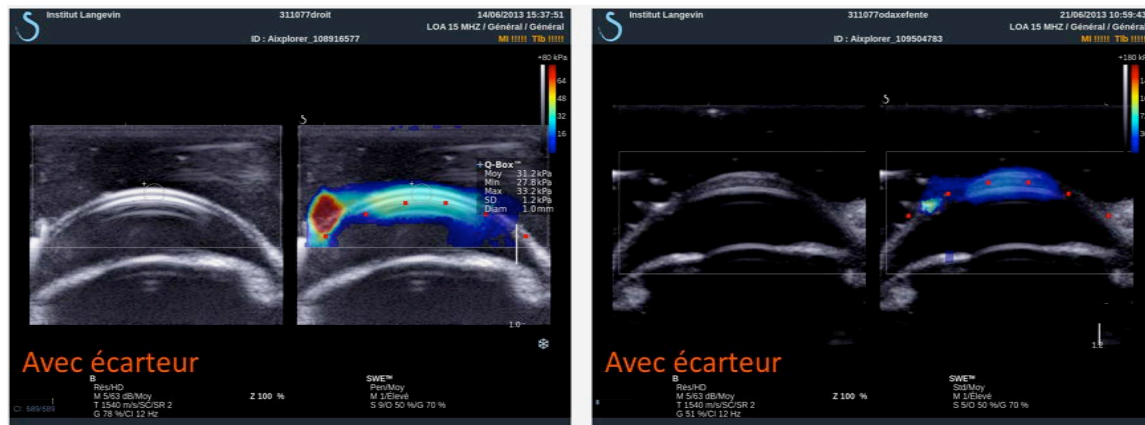
#### 1 - Evaluations élastographiques *in vivo*

##### a - CXL accéléré (A-CXL), sans épithélium (EPI-OFF)

Nous avons voulu tester sur les deux premiers lapins le protocole A-CXL EPI-OFF. Les résultats immédiats n'ont pas été très concluants en raison de l'apparition de complications à J7. Le Lapin 2 a ainsi présenté des complications de cicatrisation épithéliale sévères et le Lapin 3 a présenté un œdème de cornée évident rendant difficile l'analyse élastographique.



**Figure 89 :** Complication cornéenne à J7 du A-CXL EPI-OFF Lapin 2 OD (retard de cicatrisation avec large ulcération centrale).



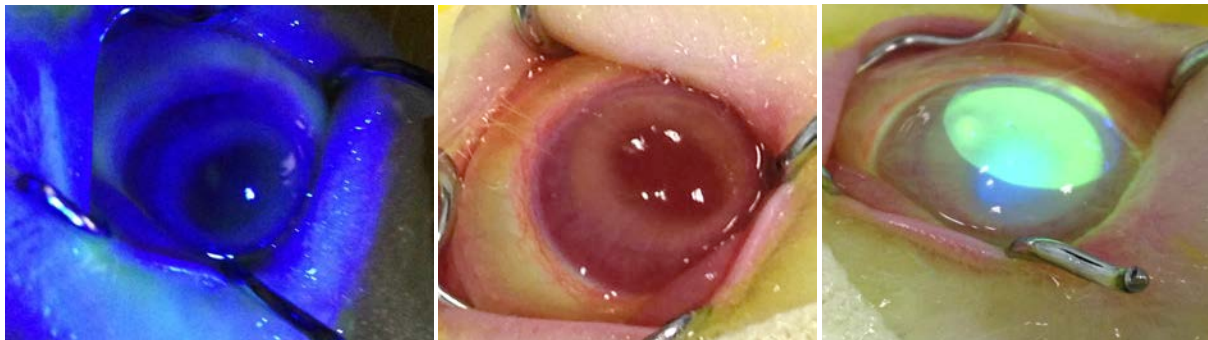
**Figure 90 :** Analyse élastographique de la cornée OD du Lapin 3 ayant présenté un œdème à J7 post A-CXL EPI-OFF. L'examen préopératoire J0 est à gauche, le J7 est à droite. On visualise bien le gonflement de la cornée centrale devenue bien plus molle qu'en préopératoire.

Nous avons donc abandonné la réalisation de procédure EPI-OFF *in vivo*, rendant les mesures non fiables du fait d'une cicatrisation bruyante et aléatoire des lapins. La procédure de CXL EPI-ON assisté par iontophorèse (I-CXL) a ainsi été retenue pour tous les CXL ultérieurs.

### b - I-CXL

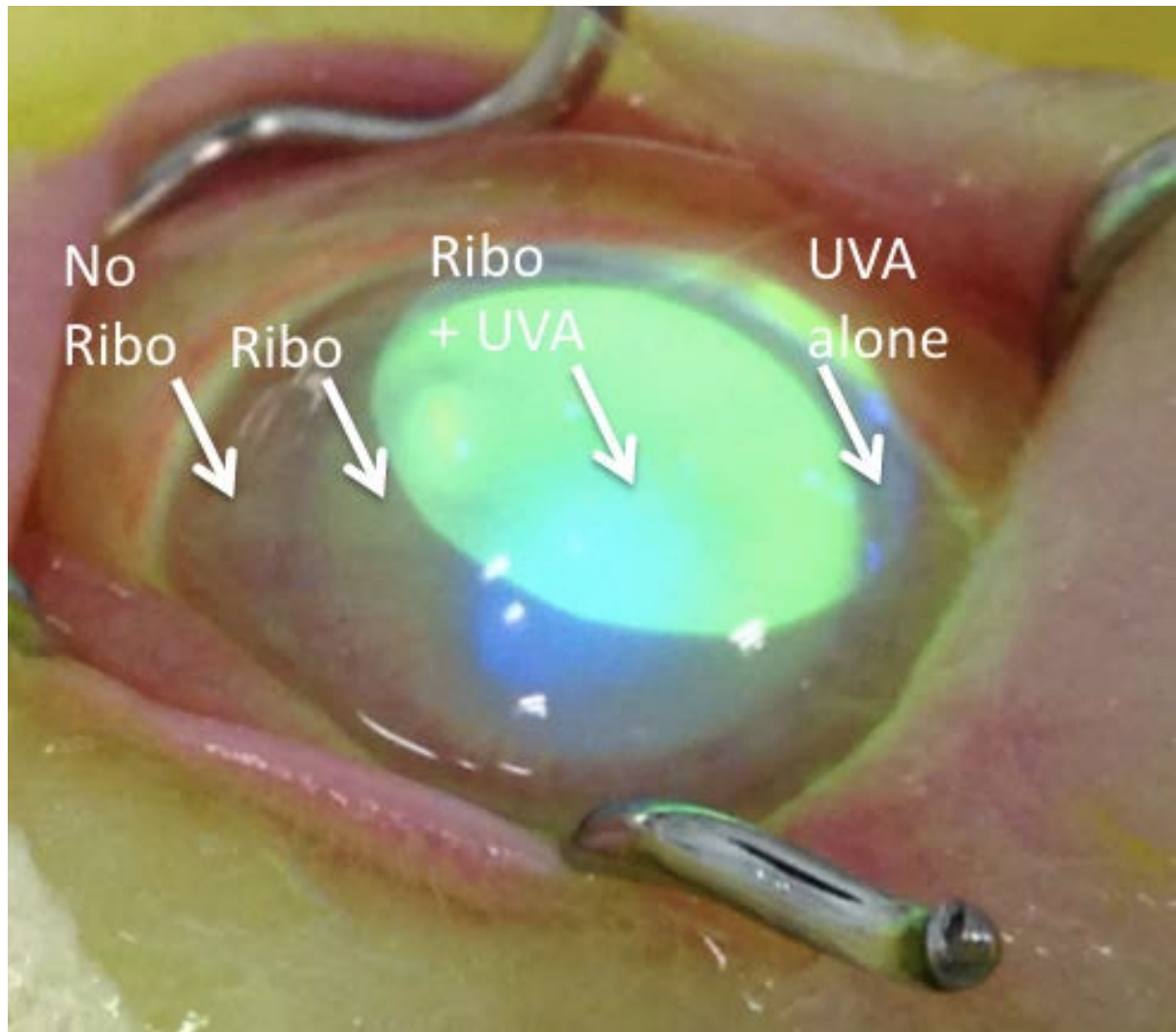
La première observation intéressante fut de vérifier l'absence de dégradation de l'épithélium et la bonne imprégnation de la cornée après la procédure de I-CXL (détaillée plus haut). **Cf. Figure 91.** Dans les faits, la coloration des cornées par la Fluorescéine observée en lumière bleue restait immanquablement négative tout au long des protocoles. Le caractère confusionnel pour le couple absorption/fluorescence entre la riboflavine et la Fluorescéine à déjà été discutée plus haut.

L'accumulation de la riboflavine dans la cornée centrale était facilement observable en lumière blanche (LAF) et perçue comme un disque jaune bien visible devant les iris clairs des lapins. La fluorescence de la riboflavine était ensuite observable lors de l'application des UV-A, il existait ainsi une nette démarcation entre la zone centrale imprégnée et la périphérie, exclue par la zone d'application de la iontophorèse. Nous pouvions donc être rassuré sur le passage de la riboflavine à travers la cornée. Son niveau de pénétration et d'homogénéité en profondeur restaient néanmoins inconnus.



**Figure 91 :** Preuves de l'intégrité de l'épithélium au test à la Fluorescéine (gauche) de la pénétration trans-épithéliale de la riboflavine sans (milieu) et avec (droite) exposition décalée aux UV-A (Cf. Grossissement image plus bas).

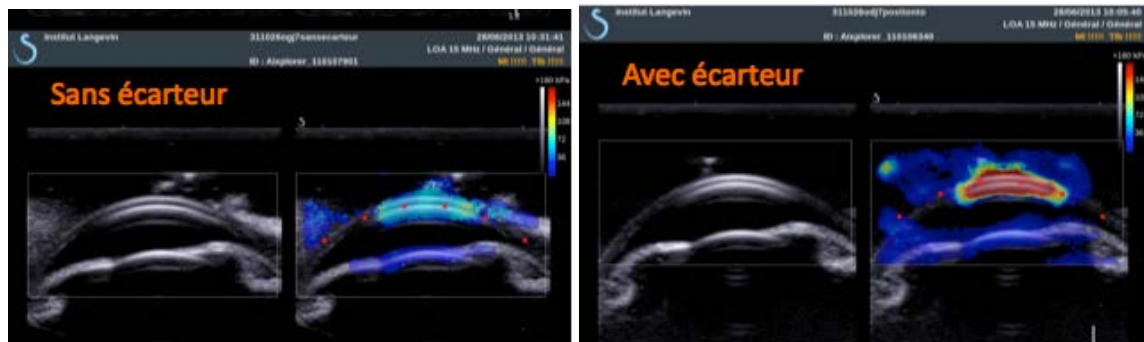




**Grossissement de la Figure 91 (Droite)** montrant bien les différentes zones d'intérêt après I-CXL en épi-observation pendant les UV-A.

Le deuxième point important dans nos résultats fut que nous ayons dû faire face à bon nombre de résultats élastographiques déroutants avant d'abandonner l'analyse *in vivo* de l'effet du I-CXL avant de nous orienter vers une analyse purement *ex vivo* mais mieux contrôlée.

En premier lieu, la mise en place d'un écarteur semblait changer totalement la dureté mesurée, avec ou sans l'intervention du I-CXL. Cf. **Figure 92**. La traction des paupières sur un globe très compressible devait induire une élévation de la PIO et secondairement de la dureté.



**Figure 92** : OD Lapin 4 examiné avec (droite) ou sans écarteur(gauche), J7 après I-CXL.

En supprimant l'écarteur, grâce à l'usage de bandes d'adhésif collées sur les poils afin d'ouvrir la fente palpébrale, nous avons moins de fluctuations. Cf. **Figure 93**. Cependant, le niveau d'endormissement (tonus palpébral plus ou moins actif) et la compression du globe contre le plan de travail lorsque l'autre œil était examiné (voir section sur le positionnement des lapins) furent deux paramètres confondants rendant la comparaison entre l'œil traité et l'œil témoin très incertaine. Cf. **Figure 94**.

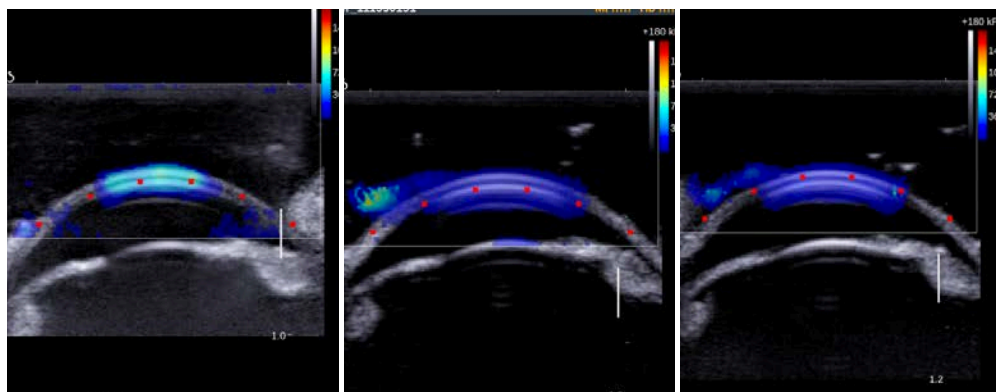


**Figure 93** : Utilisation d'adhésif pour rétracter les paupières, la troisième paupière pose problème si le tonus palpébral n'est pas bon (relâchement total de l'animal pendant l'anesthésie générale).

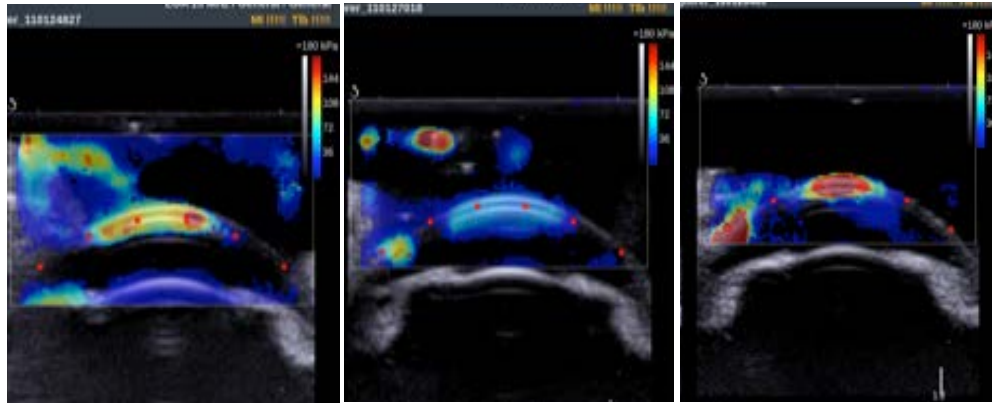


**Figure 94 :** OG lapin 4 (non traité) est noté paradoxalement plus dur sans écarteur qu'avec mais l'examen de l'OG à J0 a été réalisé après le temps du I-CXL OD alors que celui du J7 est examiné beaucoup plus rapidement, le temps de compression présumé de l'OG sur la table est donc largement supérieur à J0 par rapport à J7.

Nous avons ainsi dû restreindre notre approche en travaillant sans écarteur (à partir du Lapin 7) et en ne comparant plus que l'OD qu'avec lui même, toujours traité en premier, à un niveau similaire d'endormissement (5 min après une nouvelle injection de sédatif), sur une même session. De la sorte, nous avons pu identifier un autre biais en comparant l'élasticité avant/après iontophorèse et UV-A. En effet, comme illustré pour le lapin 11, la succion appliquée pour maintenir l'anneau de iontophorèse devait faire elle aussi baisser transitoirement la PIO et donc diminuait artificiellement la dureté. Cf. **Figures 95-96**. Il devenait ainsi difficile de mesurer fiablement l'effet du I-CXL le jour même de l'intervention. Le Lapin 12 a néanmoins pu démontrer un net durcissement après une deuxième période d'UV-A. Il restait cependant difficile de trancher entre un rebond de la PIO à distance de la succion, un discret réveil de l'animal lié à l'allongement de la procédure ou un réel durcissement de la cornée.

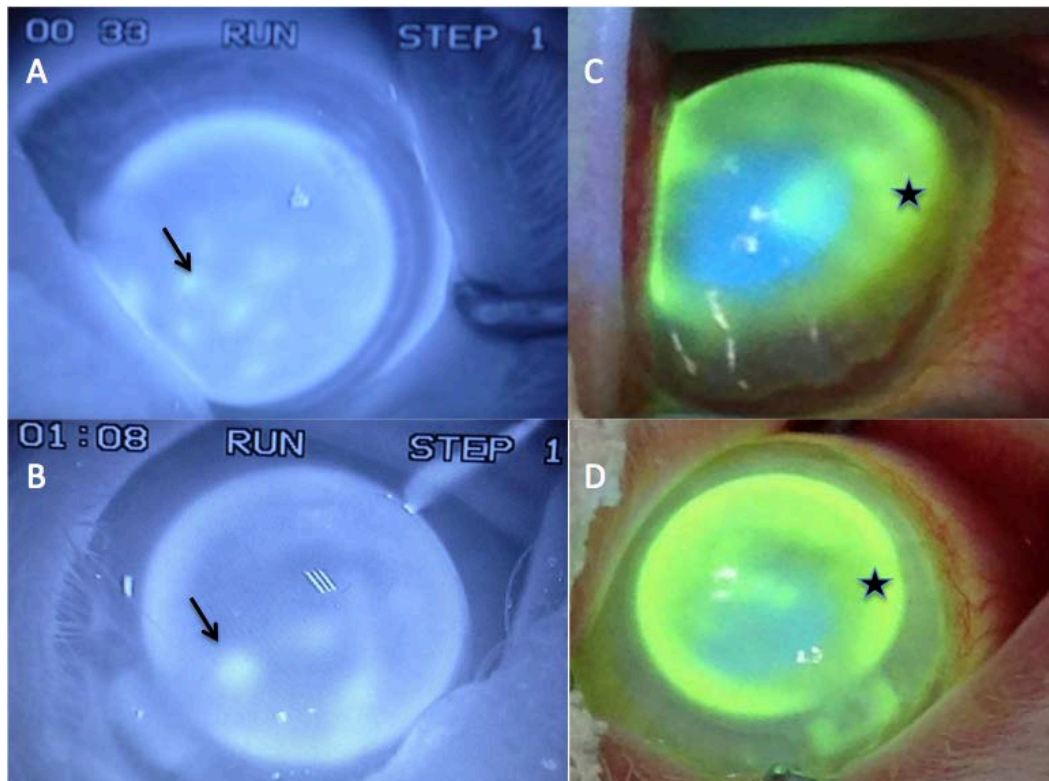


**Figure 95 :** Lapin 11, OD. La dureté de la cornée est diminuée après deux périodes de 5 minutes de iontophorèse, et ne remonte pas après les UV-A. A gauche= avant, au milieu =après ionto, à droite=après UV-A.



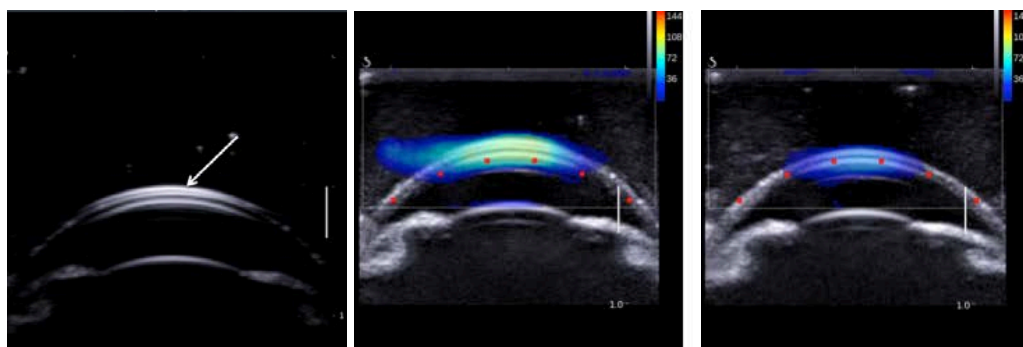
**Figure 96 :** Lapin 8 OD. La dureté de la cornée était parfois retrouvée plus importante avant I-CXL (ionto + UV-A, image de gauche) qu'après (image du centre), la réalisation d'un deuxième temps d'UV-A (9 min) avait pu inverser la tendance (image de droite).

Troisième point important des résultats : les différents essais de cette phase expérimentale ont permis de constater une certaine inhomogénéité d'imprégnation de la riboflavine dans le périmètre du dispositif de iontophorèse (anneau d'imprégnation). Il existait systématiquement un anneau de renforcement périphérique constant avec des zones focales de renforcement de taille, formes et localisations variables. Cette constatation ne fut pas très influencée par la réalisation d'un deuxième cycle de iontophorèse, jugé finalement utile pour la suite des expérimentations afin de saturer au mieux la cornée du lapin dont la perméabilisation ne nous avait pas parue parfaite. L'origine de ces spots sera rediscutée plus loin dans la partie traitant des résultats des tests d'inflation de pression *ex vivo*.



**Figure 97 :** Lapins 7 (haut) et 8 OD (bas). Illustration des inhomogénéités de fluorescence de la riboflavine lors des UV-A (flèches = hot spots/ étoile = anneau périphérique), persistant malgré deux cycles de iontophorèse. Images obtenues via la caméra du X-linker à Gauche, et via un appareil photo numérique à Droite.

Enfin, avant de passer aux tests effectués *ex vivo*, nous avons pu réaliser des essais complémentaires sur les lapins 9, 10 et 11, avant énucléation. Ces essais consistaient à voir si une lentille de contact souple apposée sur l'œil modifiait la perception de la dureté de la cornée car cela pourrait être un enjeu important en vue d'un prototype d'interface œil/machine adapté à la clinique. Nous avons ainsi pu constater que la dureté était artificiellement augmentée par l'apposition d'une lentille.



**Figure 98 :** Image mode B de la lentille de contact (gauche-flèche) ; images élastographiques de la cornée avec (milieu) ou sans la lentille de contact (droite).

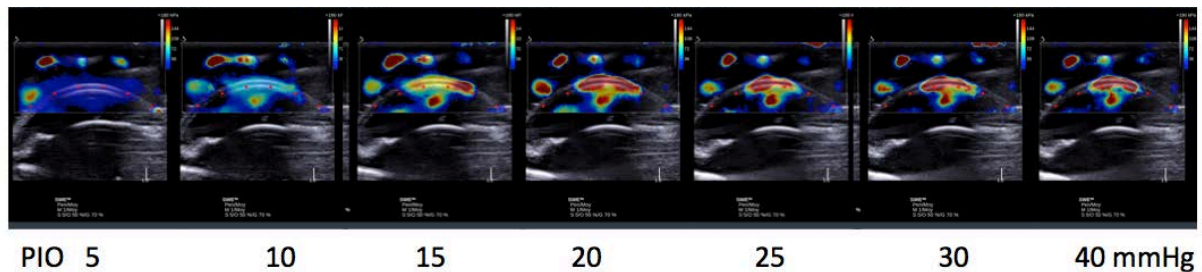


## 2 - Evaluations élastographiques *ex vivo*

### a - Tests d'inflation

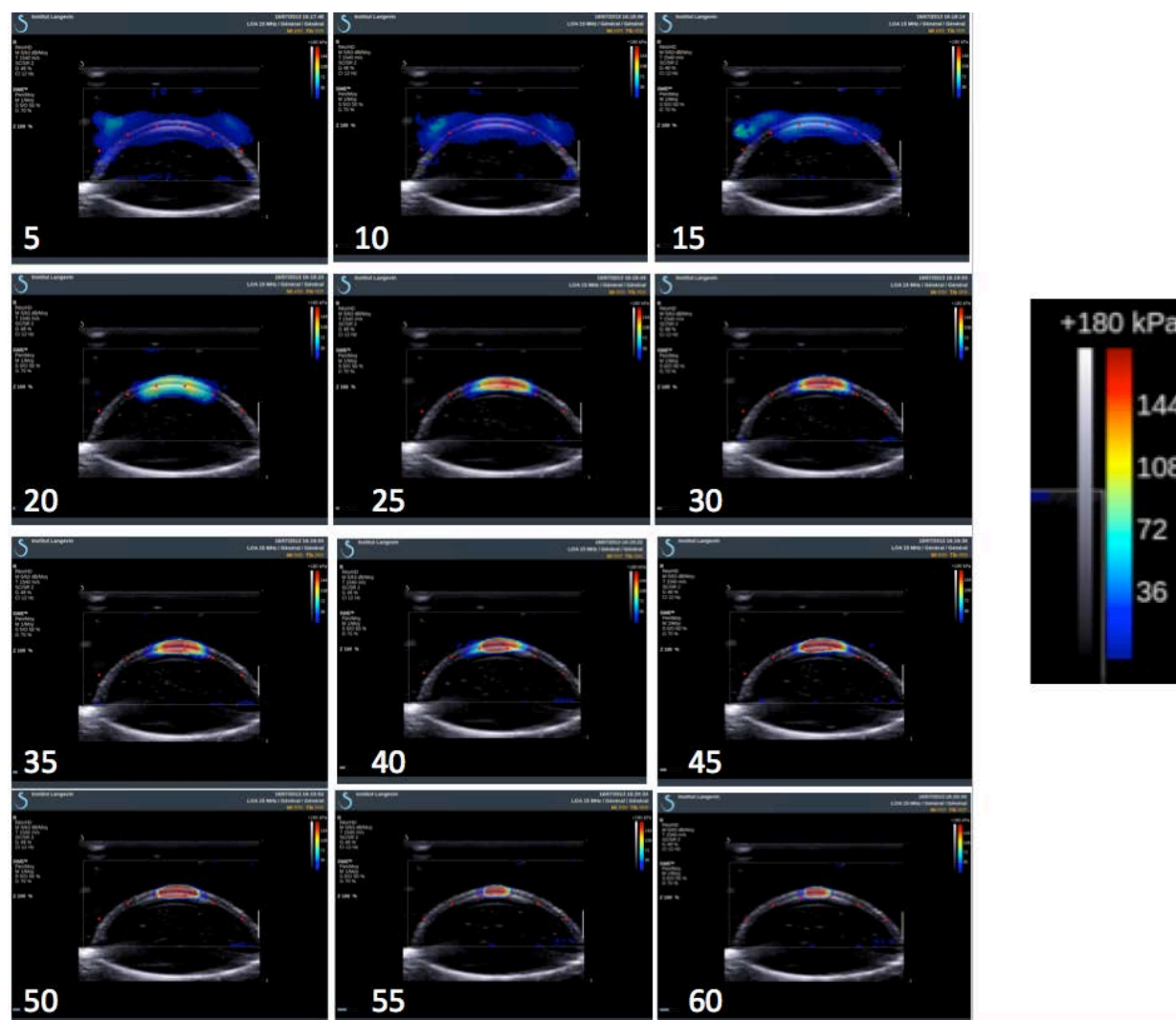
#### i - Approche préliminaire

L'énucléation des lapins 9,10 et 11 nous ont permis de tester la faisabilité de l'inflation de pression dans le globe entier énuclée. **Cf. Figure 99.** Celle-ci fut possible uniquement avec le lapin 9 OG, les fuites dans le système furent trop importantes avec les autres globes énuclées. Nous n'avons ainsi pas pu faire d'évaluation numérique reproductible.



**Figure 99 :** Lapin 11 OG, la corrélation entre la pression d'inflation du globe (PIO) et la dureté semble assez nette.

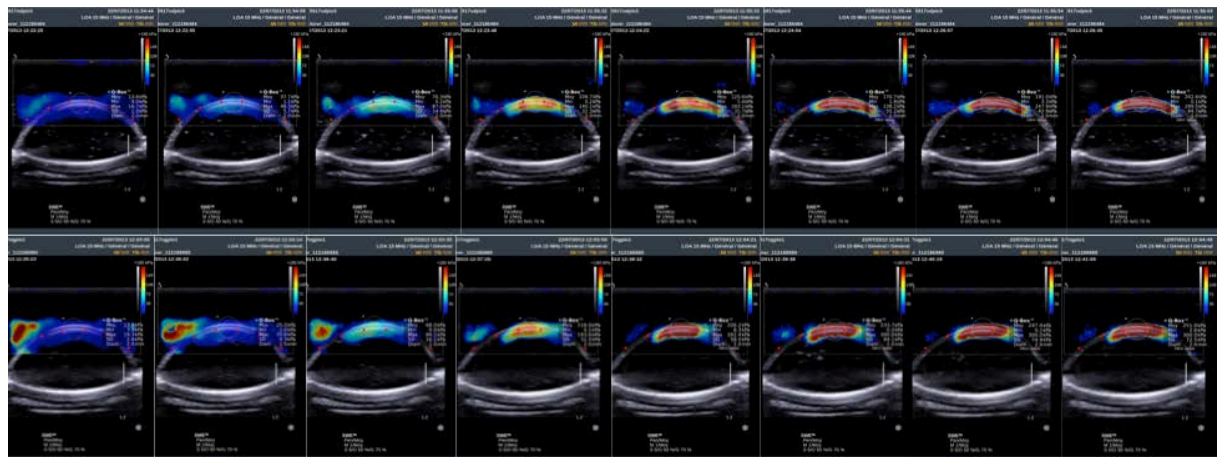
A l'issue de nos premiers I-CXL réalisés *in vivo*, nous avons donc dû standardiser au maximum la comparaison entre l'œil traité et l'œil témoin tout en sensibilisant les différences dans une approche dynamique d'élévation de la mise en tension du tissu. Les tests d'inflation ont ainsi pu démasquer une différence significative entre les deux yeux d'un même lapin. L'illustration ci-dessous montre bien tous les aspects de la progression de l'image obtenue en fonction du niveau de pression exercé. **Cf. Figure 100.** On remarquera d'emblée un très modeste bombement de la surface oculaire et une franche restriction de la zone d'analyse élastographique utile se majorant en fonction de l'élévation de la pression.



**Figure 100** : Images élastographiques mesurées en fonction de la pression d'inflation augmentée de 5 à 60 mmHg (par incrément de 5 mmHg).

## ii - Application de la procédure pour 6 lapins : courbes pression/élasticité

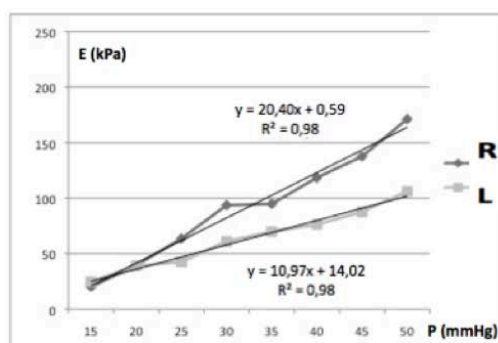
Nous avons ainsi pu mesurer les deux cornées de 6 lapins consécutifs afin d'obtenir 8 valeurs d'élasticité correspondant à 8 paliers de pressions compris entre 15 et 50 mmHg par incréments de 5 mmHg. Comme illustré ci-dessous avec le cas du Lapin 14, les différences n'étaient pas faciles à voir à « l'œil nu » et les résultats furent traduits sous formes de tableaux et de courbes après analyse avec l'outil Qbox. **Cf. Figures 101-106.**



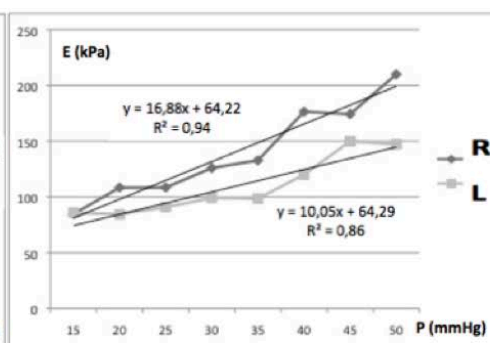
**Figure 101** : Images élastographiques du Lapin 14 OD (en haut - I-CXL) et OG (en bas - témoin) pour 8 valeurs de pressions croissantes (de gauche à droite), comprises en 15 et 50 mmHg, par incréments de 5 mmHg.



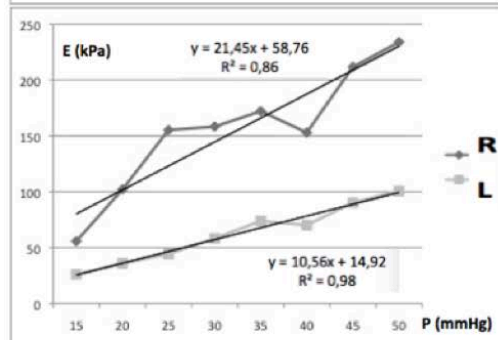
12



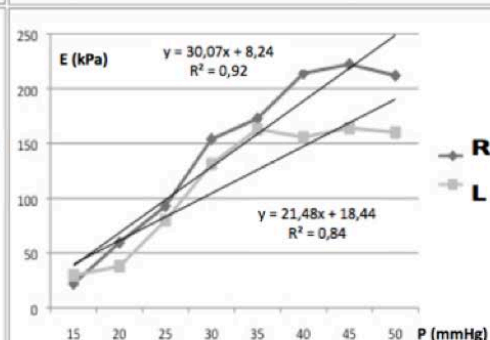
15



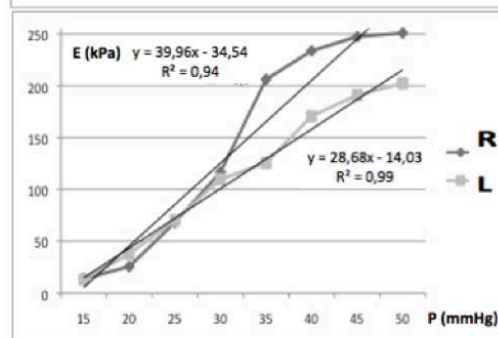
13



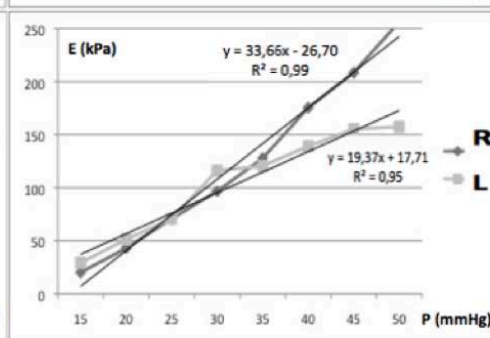
16



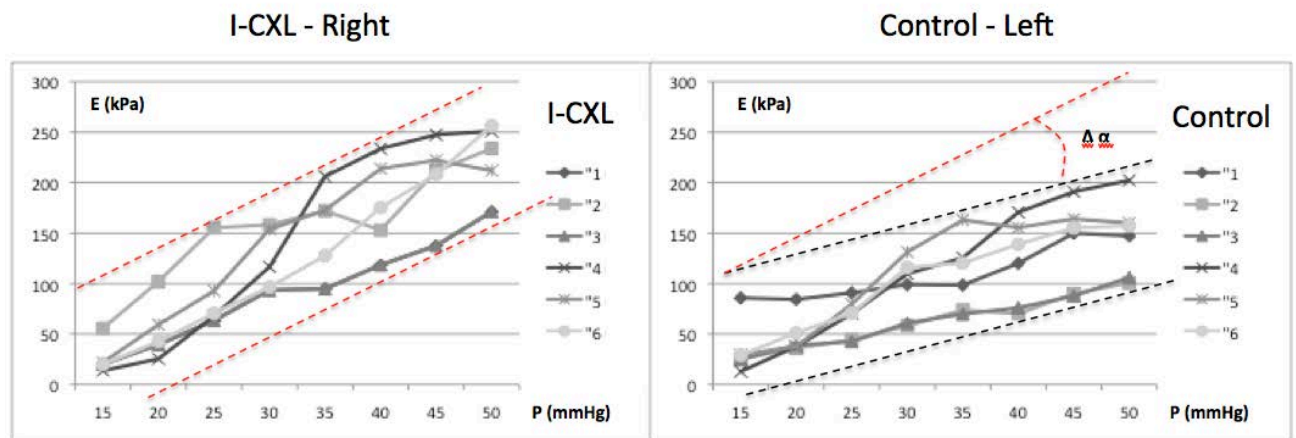
14



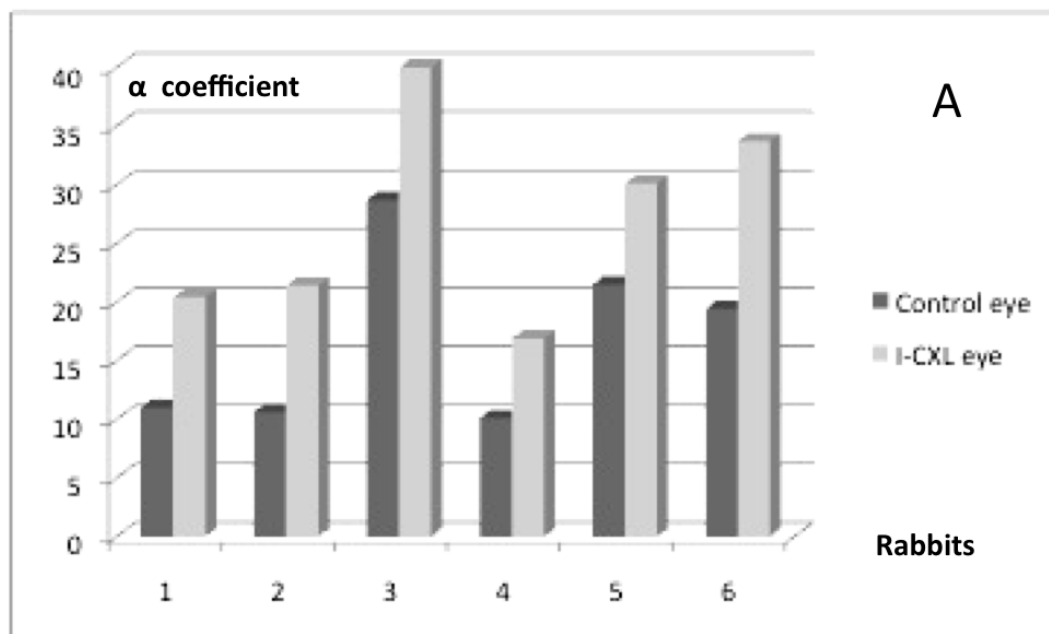
17



**Figure 102 :** Courbe d'élasticité/pression d'inflation pour les 6 lapins examinés. L'œil droit traité par I-CXL (R) et l'œil gauche (L) témoin sont figurés sur le même graphique avec la représentation de la fonction linéaire correspondante (courbe de tendance).



**Figure 103 :** Regroupement des différentes courbes pour les yeux traités par I-CXL (à gauche) et les yeux témoins (à droite). L'angle  $\Delta \alpha$  représentant la différence d'angulation des paquets de courbes est figuré.



**Figure 104 :** Représentation en histogramme des valeurs du coefficient alpha entre les deux groupes.

<b>Lapins</b>	$\alpha$ D	$\alpha$ G	$\alpha$ variation D-G	$\beta$ D	$\beta$ G	$\beta$ variation D-G
<b>12</b>	<b>20.4</b>	<b>11</b>	<b>9.4</b>	<b>0.6</b>	<b>14</b>	<b>-13.4</b>
<b>13</b>	<b>21.4</b>	<b>10.6</b>	<b>10.8</b>	<b>58.8</b>	<b>14.9</b>	<b>43.9</b>
<b>14</b>	<b>40</b>	<b>28.7</b>	<b>12.7</b>	<b>34.5</b>	<b>14</b>	<b>20.5</b>
<b>15</b>	<b>16.9</b>	<b>10.1</b>	<b>6.8</b>	<b>64.2</b>	<b>64.3</b>	<b>-0.1</b>
<b>16</b>	<b>30.1</b>	<b>21.5</b>	<b>9.6</b>	<b>8.2</b>	<b>18.4</b>	<b>-9.8</b>
<b>17</b>	<b>33.7</b>	<b>19.4</b>	<b>14.3</b>	<b>26.7</b>	<b>17.7</b>	<b>9</b>
<b>Moyenne</b>	<b>27,1</b>	<b>16,9</b>	<b>10,2</b>	<b>32,2</b>	<b>23,9</b>	<b>8,4</b>

**Figure 105** : Coefficients  $\alpha$  and  $\beta$  des courbes de régression linéaire ( $E = \alpha P + \beta$ ) et leur variation correspondante entre le côté droit (D) et le côté gauche (G).

<b>Pression de charge mmHg</b>	<b>OD E moyennes (ET) (kPa)</b>	<b>OG E moyennes (ET) (kPa)</b>	<b>p ANOVA test</b>
15	36 (28)	34 (25)	0.9326
20	62 (34)	47 (18)	0.3629
25	93 (34)	66 (19)	0.1324
30	124 (30)	95 (33)	0.1200
35	151 (39)	108 (35)	0.0790
<b>40</b>	<b>178 (41)</b>	<b>121 (41)</b>	<b>0.0395</b>
<b>45</b>	<b>200 (38)</b>	<b>139 (41)</b>	<b>0.0262</b>
<b>50</b>	<b>222 (31)</b>	<b>145 (37)</b>	<b>0.0034</b>
<b>Moyenne</b>	<b>133 (34)</b>	<b>95 (32)</b>	-

**Figure 106** : Valeur du module de Young moyen en fonction de la pression de charge. La valeur statistique de la comparaison des deux yeux est notée sur la colonne de droite. N = 6.

L'analyse des courbes montre une différence d'inflexion modeste mais significative après 40 mmHg. La pente moyenne est augmentée d'un facteur 1,6 après I-CXL, avec une inflexion plus nette après 40 mmHg. La différence d'élasticité est minime aux basses pressions et plus évidente dans le régime des plus hautes pressions.

### iii - Analyse des variations de l'épaisseur cornéenne pendant les expérimentations

Les principaux résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Pmc Lapins (microns)		Pmc pre- IONTO	Pmc post- IONTO	Pmc post- UVA	Pmc pré SSI (ex vivo)	Pmc post SSI (ex vivo)	Pmc difference D-G pré SSI (ex vivo)	Pmc difference D-G post SSI (ex vivo)
Valeur p (D versus G)		0.52			0.43	0.91		
12	D	375	390	385	410	400	25	5 (-)
	G	395			385	405		
13	D	390	420	365	395	380	5	25 (-)
	G	380			390	405		
14	D	355	375	380	405	410	10	30 (-)
	G	380			395	380		
15	D	390	410	400	425	385	35	15 (-)
	G	395			390	400		
16	D	400	370	350	400	370	5 (-)	15 (-)
	G	415			405	395		
17	D	420	410	380	370	410	25 (-)	5 (-)
	G	390			395	415		
Moyenne D		388	395	376	400	392	17	15
ET		22	21	18	18	16	12	10
Moyenne G		392			393	400		
ET		12			6	11		

**Figure 184 :** Epaisseur cornéenne centrale (Pmc) mesurée avec pachymètre à US aux différents temps de l'expérimentation. Les valeurs ont été arrondies à 5 microns près.

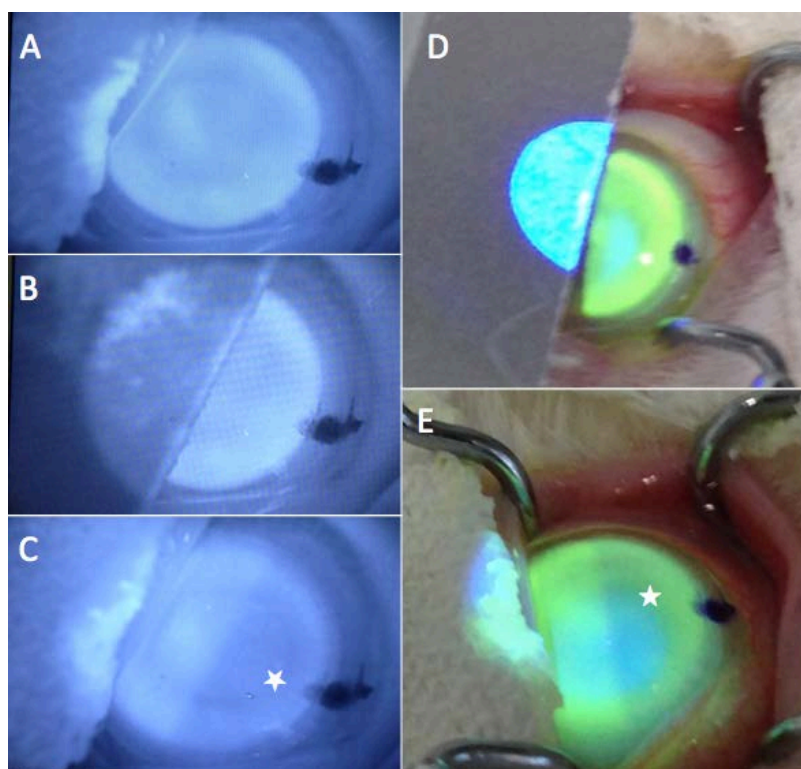
## b - Tests d'anisotropie

### i - Choix de la pression d'équilibre

Les tests d'anisotropie ont été pratiqués à une valeur de pression constante de 25 mmHg, intermédiaire avec une valeur trop basse pouvant amener à un affaissement géométrique de la cornée et une valeur trop haute inhibant la mise en vibration du tissu par la sonde.

### ii - Preuve de la consommation de riboflavine

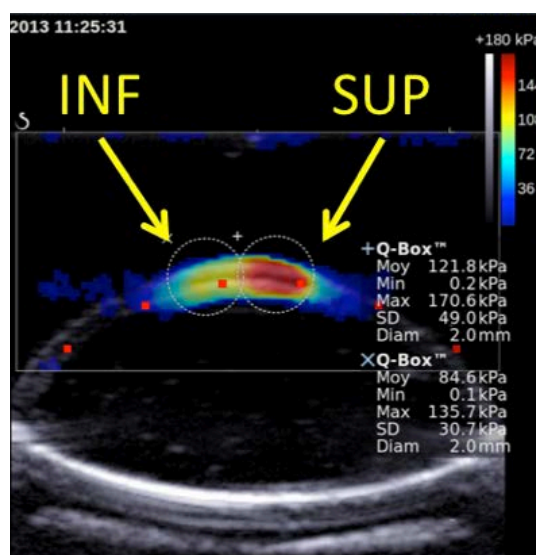
Le CXL a été effectué, comme préalablement expliqué, uniquement sur l'hémi-secteur supérieur du tissu grâce à l'interposition d'un masque absorbant, en carton, positionné manuellement sur le trajet du faisceau. Il fut important de constater visuellement la consommation sectorielle de la riboflavine dans le secteur exposé aux UVA en fin de CXL. Il y avait ici la preuve indirecte d'une activation *in situ* de la riboflavine.



**Figure 107 :** Preuve du « blanchiment » des molécules de riboflavine exposées aux UVA lors d'un CXL sectoriel supérieur (point d'encre), observée en fin de procédure UVA (étoile blanche).

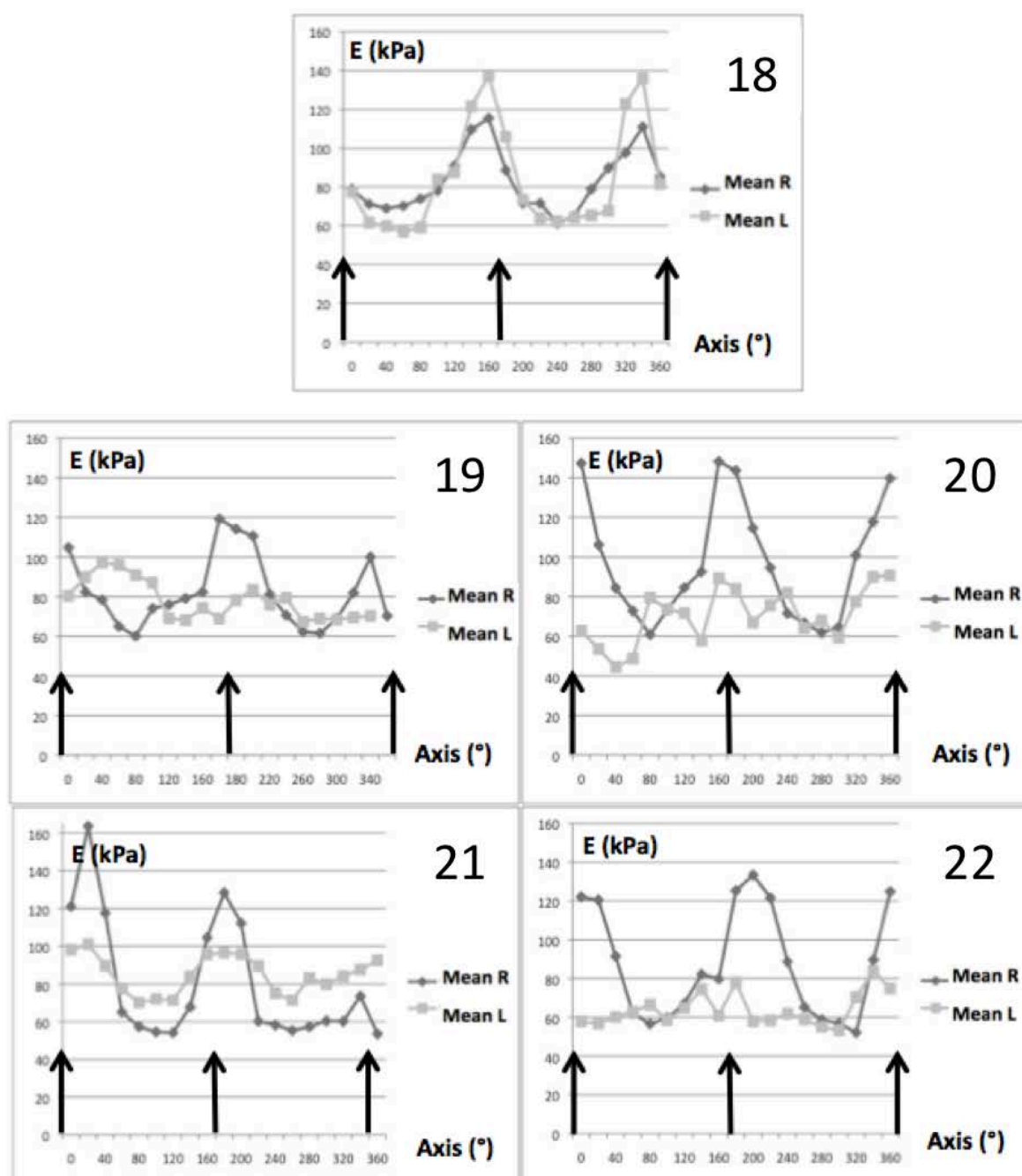
### iii - Courbes d'anisotropie

Nous nous sommes donc intéressés à l'anisotropie en essayant de regarder l'impact d'un I-CXL sectoriel sur la cartographie élastique de la cornée de 5 Lapins consécutifs. Certaines images étaient relativement évocatrices de la division des deux secteurs en terme de durcissement (disparité haut/bas) induit mais il s'est révélé difficile de reconstruire une carte d'élasticité en 3D. **Cf. Figure 108.** L'alignement imparfait entre le centre du traitement CXL, le centre de la zone d'imprégnation de riboflavine, le centre de la coupe élastographique et le centre de la cornée furent probablement des facteurs en partie responsable des disparités constatés. La moyenne des valeurs d'élasticité sur l'axe d'un méridien nous a ainsi paru plus pertinente afin de lisser en partie les aléas d'alignement, difficilement contournables avec les contraintes imposées par notre montage expérimental.



**Figure 108 :** Lapin 18, coupe sur méridien verticale, disparité haut/bas illustrant le I-CXL sectoriel supérieur (pression d'inflation = 25 mmHg).

La moyenne des valeurs de l'élasticité moyenne sur 18 méridiens, centrées sur l'apex cornéen, a permis de tracer un diagramme dont l'anisotropie était proportionnelle aux fluctuations en ordonnée des courbes. L'observation des cornées dans l'axe haut/bas montre assez clairement une élasticité moyenne plus forte que dans les autres axes pour les 4 yeux I-CXL alors que cela n'est pas évident dans le groupe des yeux témoins. Le lapin 18, démontre un profil similaire aux deux yeux car ce dernier a reçu le I-CXL de manière bilatérale. La figure suivante montre les différents profils pour les 5 lapins examinés. **Cf. Figure 187.**



**Figure 109 :** Visualisation de l'effet du I-CXL sectoriel supérieur sur 5 Lapins. Le lapin 18 a bénéficié d'un traitement identique aux deux yeux, les autres lapins n'ont été traités qu'à l'œil Droit. La flèche montre l'axe du méridien vertical, orientant le secteur de l'hémi- I-CXL.

Le cumul des 18 valeurs d'élasticité moyenne obtenues pour chaque méridien permet de voir que le niveau est très similaire pour le lapin 18 qui a bénéficié d'un traitement identique. **Cf. Figure 110.** En revanche il existe deux lapins (20 et 22) qui démontrent des différences importantes de durcissement global après I-CXL. Les différences sont non significatives pour les lapins 19 et 21. Les valeurs de la pression d'inflation et les pachymétries centrales furent cependant similaires pour ces deux derniers cas. En revanche la différence d'anisotropie est nettement moins marquée que pour les Lapins 20 et 22, l'effet du I-CXL fut peut être moindre pour ces deux cornées.

N° Lapin	Elasticité OD (kPa)	Elasticité OG (kPa)	Variation Elasticité D-G (kPa)
18	<b>1577</b>	<b>1587</b>	-10
19	<b>1524</b>	1616	-92
20	<b>1846</b>	1339	507
21	<b>1642</b>	1484	158
22	<b>1657</b>	1214	443

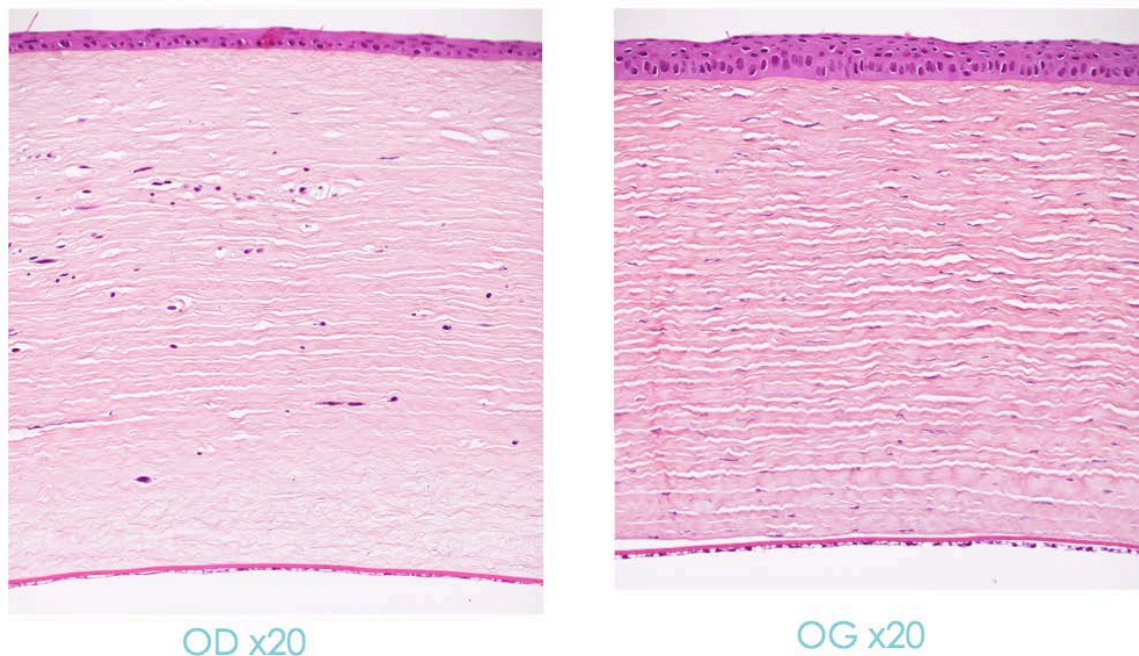
**Figure 110 :** Somme sur 18 méridiens de l'élasticités moyennes des cornées testées par I-CXL sectoriel. En gras, sont figurées les valeurs des yeux traités par I-CXL.



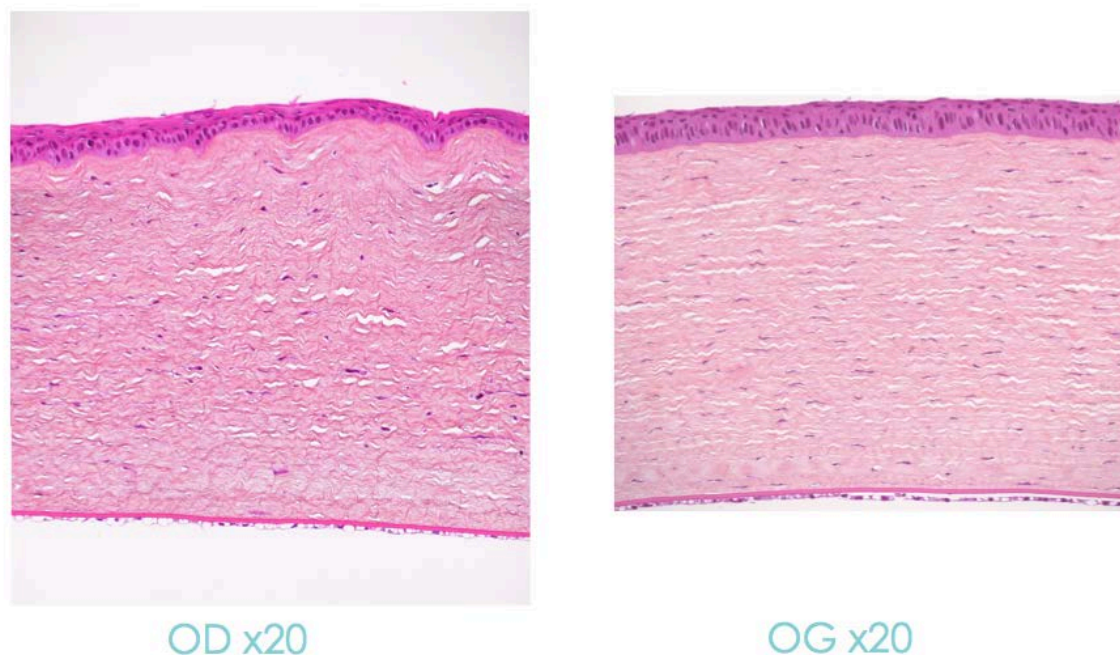
### 3- Résultats histologiques

#### a - Les deux cornées traitées par C-CXL (Lapins N° 2 et 3)

Elles démontraient une disparition importante des noyaux kératocytaires (HES) dans la moitié antérieure de la cornée. Des anomalies de régénérations de l'épithélium étaient visibles ainsi que des zones d'œdème anormales (diminution des fentes claires). **Cf. Figures 111-112.** Le marquage en CD35 ne montrait pas de différence nette avec l'œil témoin, il témoignerait possiblement de la présence des membranes cellulaires des kératocytes, enchâssées parallèlement entre les lamelles. **Cf. Figures 120-121.**



**Figure 111** : Coupe HES, cornées du lapin 2, OD: C-CXL à J7 ; OG: Témoin. Diminution nette de la densité kératocytaire (noyaux) dans le stroma antérieur, associé à la diminution du nombre d'assises cellulaires épithéliales et à la diminution des fentes claires dans la zone antérieure, signant un œdème localisé. L'endothélium est normal des deux côtés.

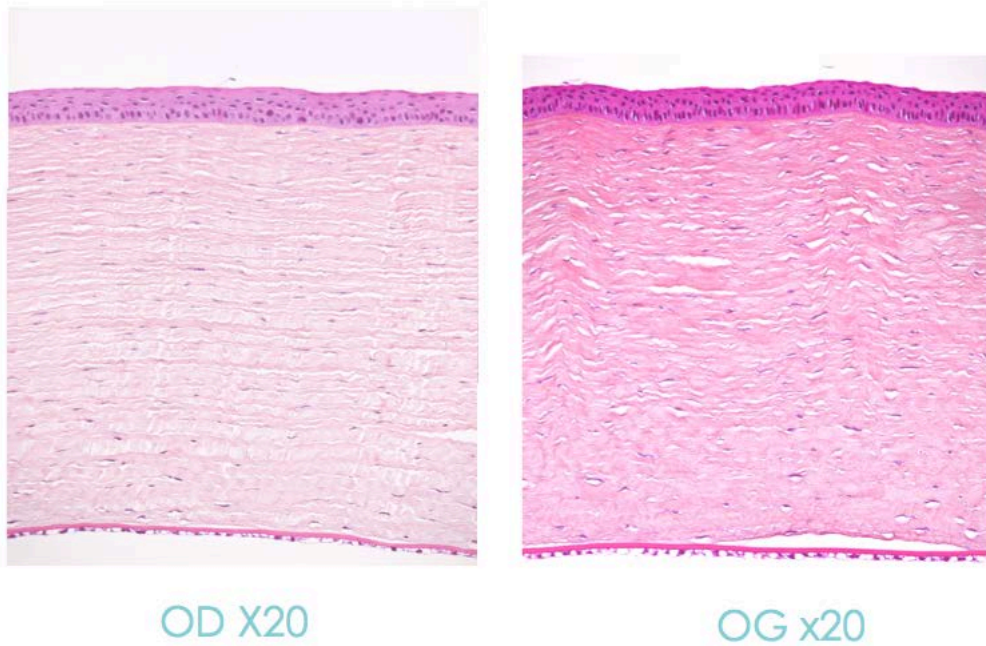


**Figure 112 :** Coupe HES, cornées du lapin 3, OD: C-CXL à J7 ; OG: Témoin. Diminution modérée de la densité kératocytaire (noyaux) dans le stroma antérieur, associé à la diminution du nombre d'assises cellulaires épithéliales. L'épithélium est très irrégulier, présentant des travées d'invaginations. La diminution des fentes claires dans la zone antérieure, signant un œdème localisé, est importante.

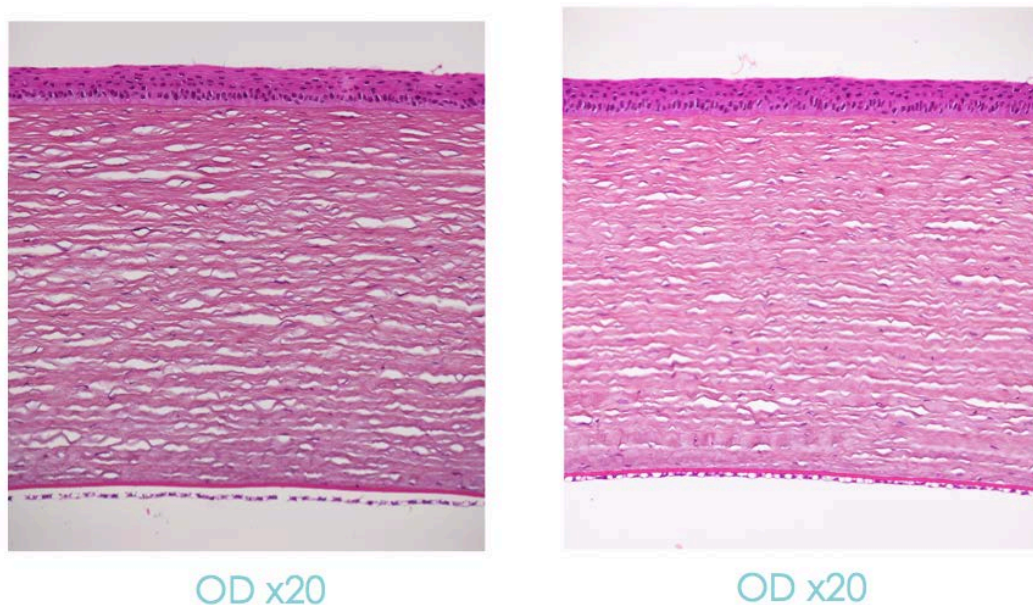
#### **b - Les cornées traitées par I-CXL (Lapins N° 4 à 11)**

Globalement, elles ne montraient pas d'altération franche de l'épithélium. Que ce soit au marquage HES (Cf. **Figures 113-119**) ou au marquage CD34 (Cf. **Figure 122**) :

- Les cornées 4 à 6 n'ont pas montré pas de différences histologiques notables par rapport au groupe témoin.
- Les cornées 7, 9 et 10, ayant bénéficié d'un temps de riboflavine doublé, ne montraient pas non plus de différences probantes par rapport au groupe témoin.
- Sur les cornées 8 et 11, ayant bénéficié d'un temps de riboflavine doublé (8) ou triplé (9) et un temps d'UV-A doublé. La cornée 8 a démontré une diminution nette des kératocytes, comparable à celle vue pour le C-CXL. La cornée 9 montrant une moins nette disparition des kératocytes mais une franche augmentation des fentes claires du stroma antérieur (augmentation de la cohésion tissulaire).

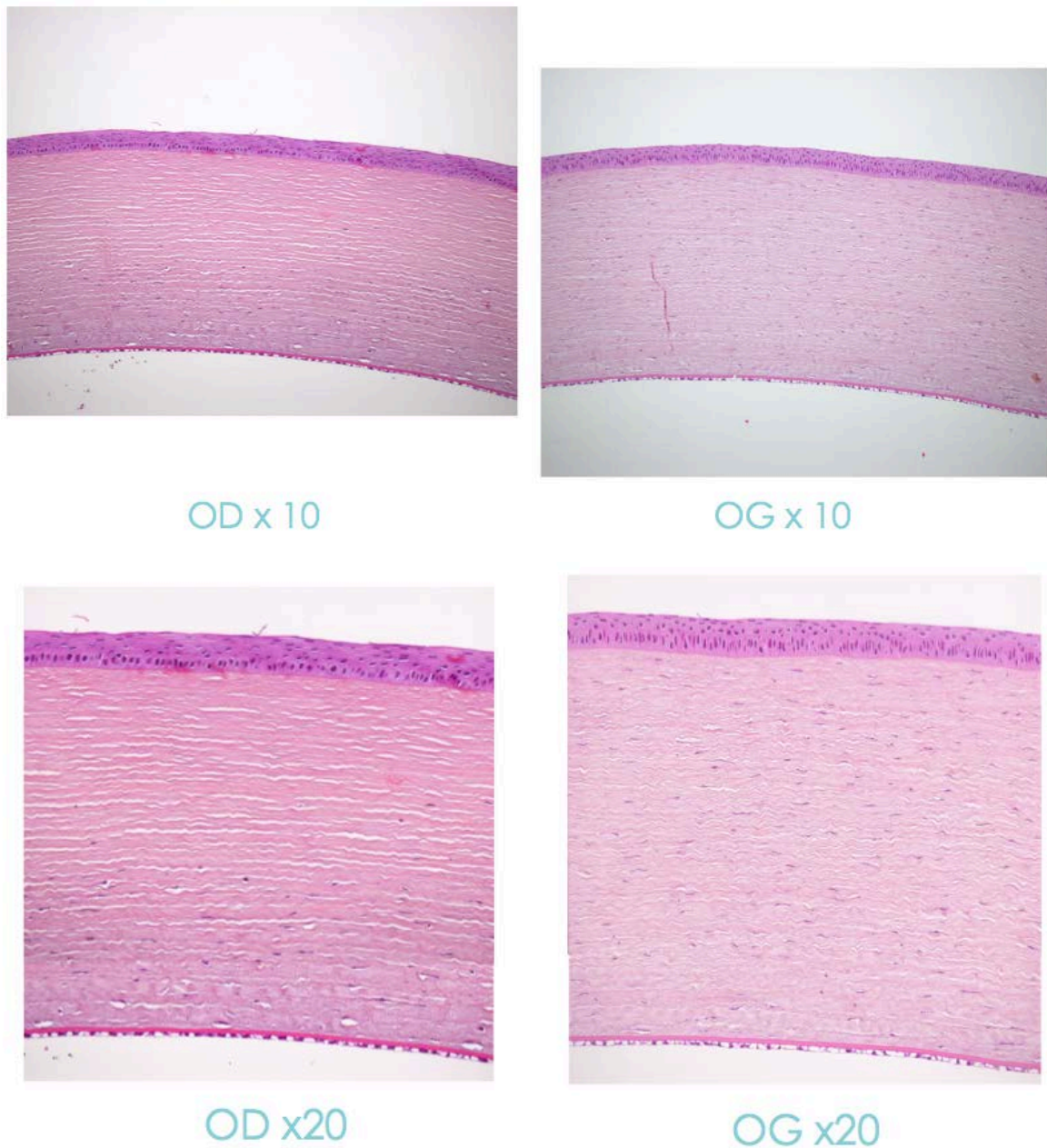


**Figure 113** : Coupe HES, cornées du lapin 4, OD: I-CXL à J7 ; OG: Témoin. Pas de diminution nette de la densité kératocytaire (noyaux) dans le stroma antérieur, pas de diminution du nombre d'assise cellulaires épithéliales ni des fentes claires dans la zone antérieure. L'endothélium est normal des deux côtés. Il existe quelques cellules en mitose au niveau de la membrane basale épithéliale de l'OD, signant un remaniement superficiel.

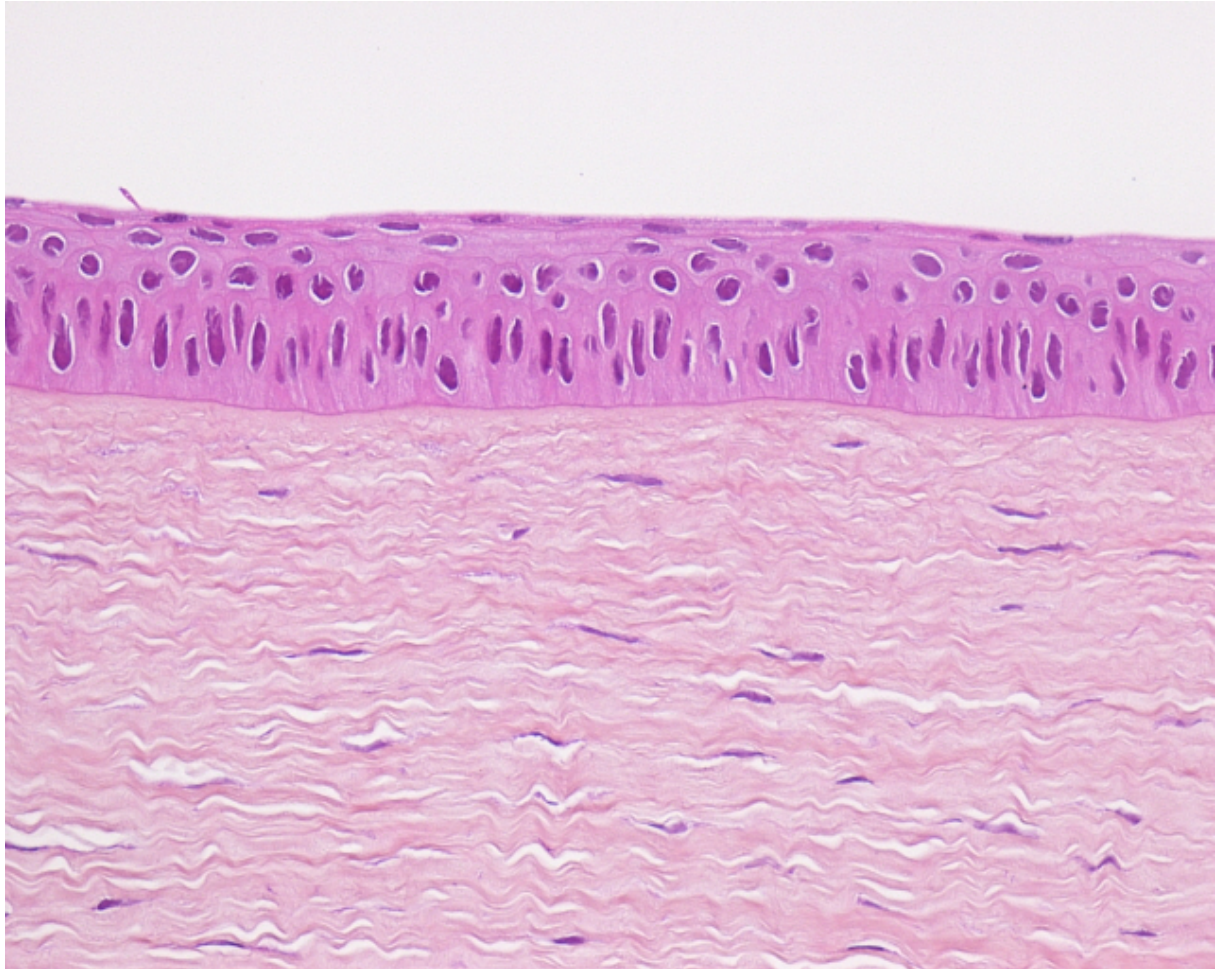


**Figure 114** : Coupe HES, cornées du lapin 7, OD: I-CXL à J7 ; OG: Témoin. Durée de iontophorèse doublée. Pas de diminution nette de la densité kératocytaires (noyaux) dans le stroma antérieur, pas de diminution du nombre d'assises cellulaires épithéliales ni des fentes claires dans la zone antérieure. L'endothélium est normal des deux côtés.





**Figure 115 :** Coupe HES, cornées du lapin 8, OD: I-CXL à J7 ; OG: Témoin. Grossissement x10 en haut, x20 en bas. Durée de iontophorèse doublée, dose d'UV-A doublée. Diminution nette de la densité kératocytaire (noyaux) dans le stroma antérieur et augmentation du nombre de fentes claires dans la zone antérieure. L'endothélium et l'épithélium sont normaux des deux côtés.

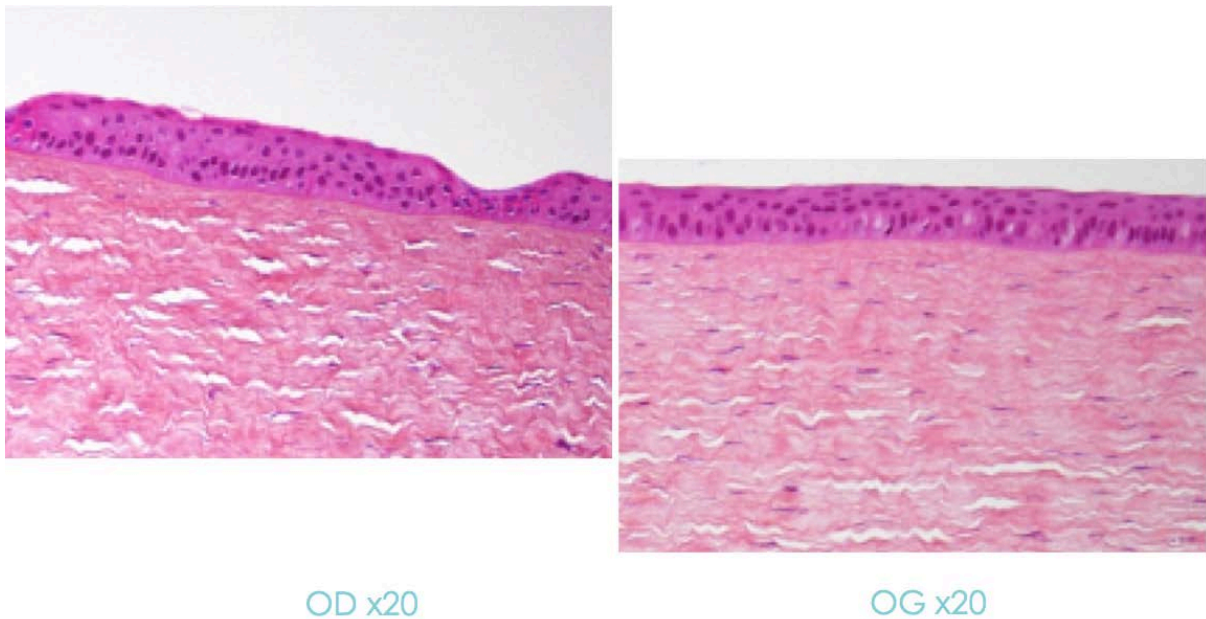


**Figure 116 :** Coupe HES, cornées du lapin 8, OG: Témoin. Grossissement x40. Montre l'aspect de l'épithélium et du stroma antérieur normal. Absence de l'équivalent de membrane de Bowman.

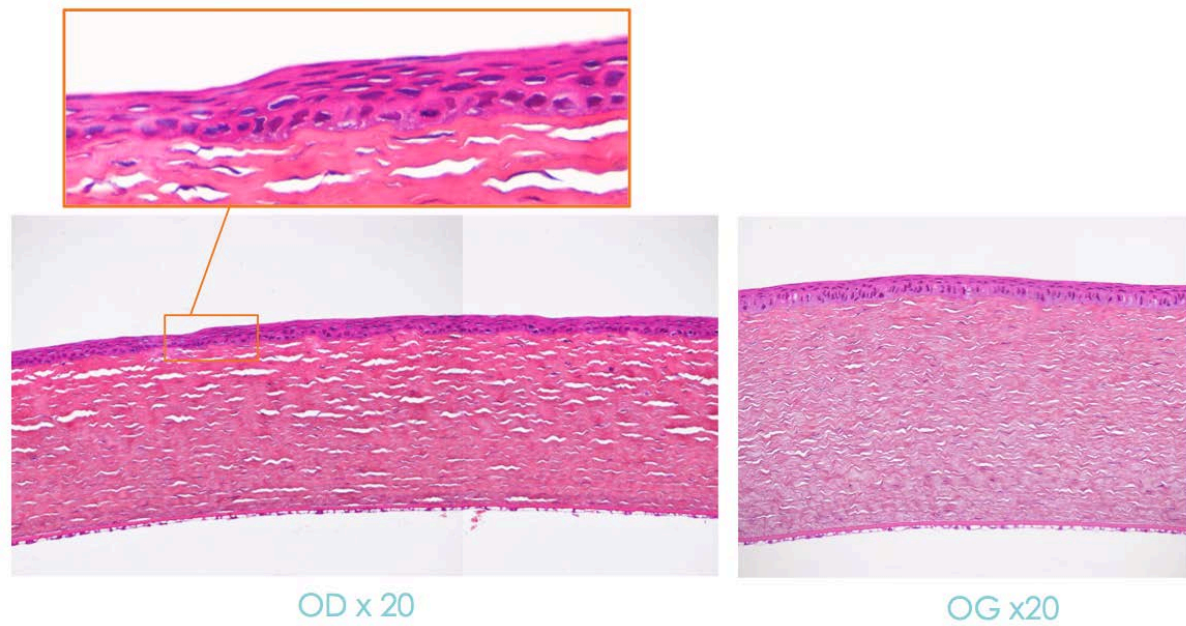




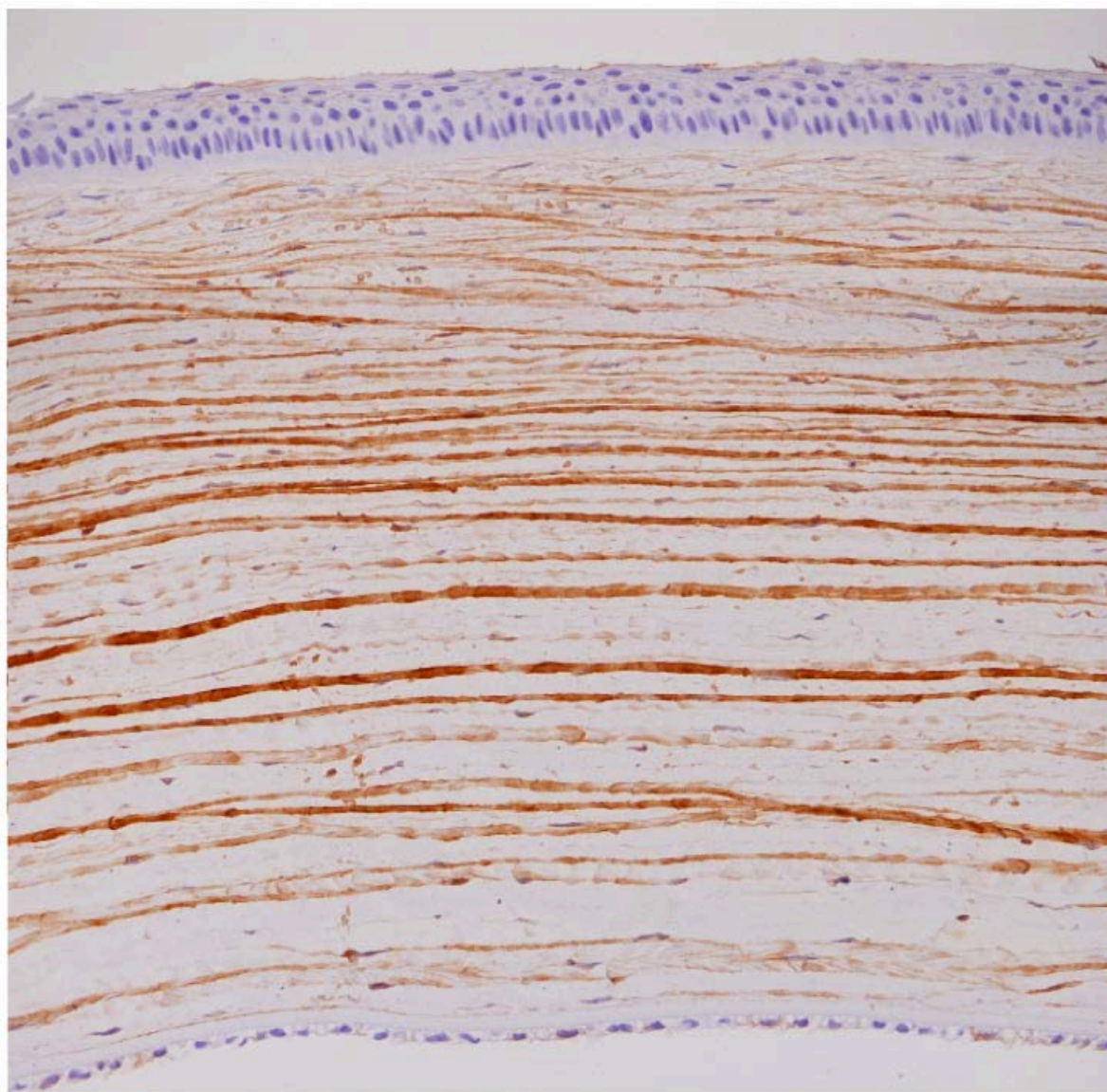
**Figure 117** : Coupe HES, cornées lapin 10, OD: I-CXL, sectoriel. Grossissement x40. Montre l'aspect de l'épithélium avec mitoses et diminution des assises. Le stroma antérieur est anormalement riche en lacunes.



**Figure 118** : Coupe HES, cornées du lapin 10, OD: I-CXL, sectoriel ; OG : témoin. Grossissement x20. Montre une plus grande densité des fentes claires pour l'OD par rapport à l'OG.

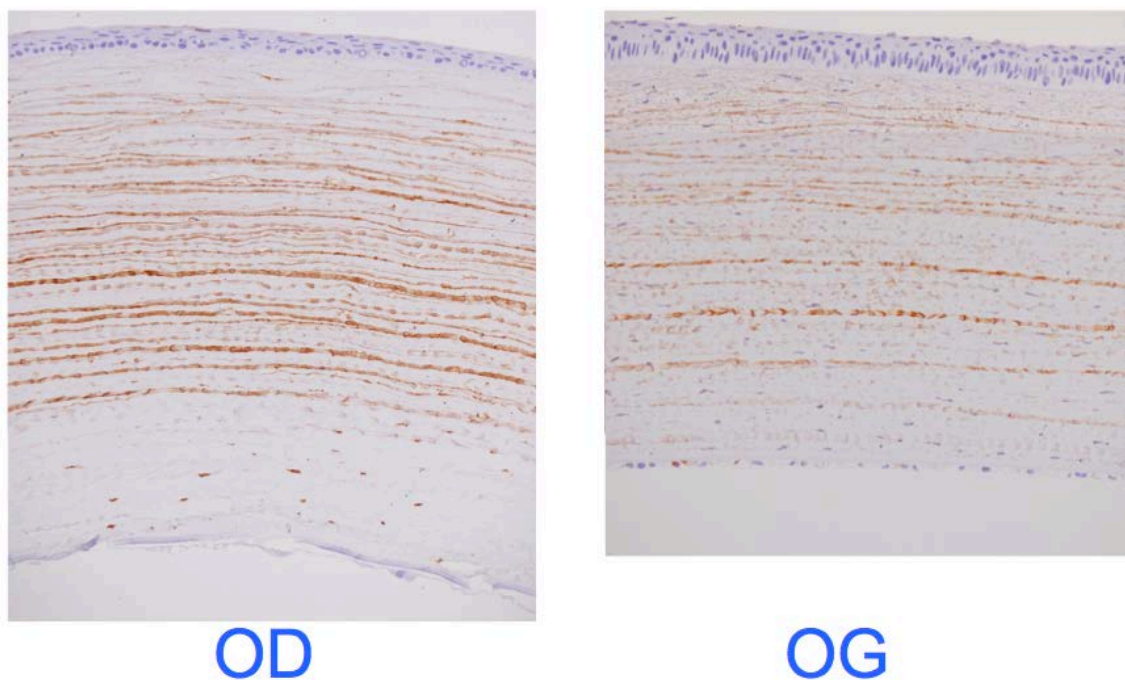


**Figure 119** : Coupe HES, cornées du lapin 11, OD: I-CXL à J7 ; OG: Témoin. Durée iontophorèse triplée. Durée UV-A doublée. Grossissement x40 dans l'encart du haut, x20 en bas. Légère diminution de la densité kératocytaires (noyaux) mais forte densité de fentes claires dans la zone antérieure. La cornée OD semble plus compacte que le témoin. Rares images de mitoses dans l'épithélium. L'endothélium est normal des deux côtés.

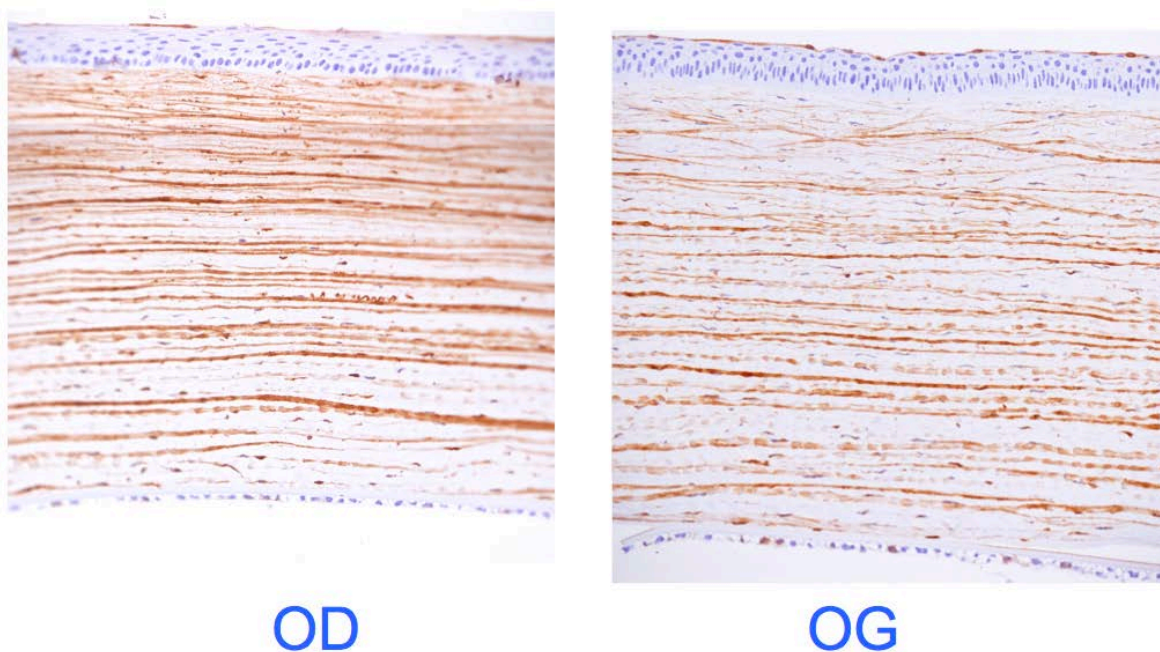


**Figure 120 :** Coupe CD34, cornées du lapin 6, OG: Témoin. Grossissement x40. Les noyaux des kératocytes sont visibles. L'orientation des travées de marquage du CD34 montre bien le plus grand enchevêtrement du réseau kératocytaire dans le stroma antérieur.





**Figure 121** : Coupe CD34, cornées du lapin 2, OD: C-CXL à J7 ; OG: Témoin. Grossissement x20. Diminution nette de la densité des noyaux kératocytaires dans le stroma antérieur. En revanche, le marquage CD34 des membranes ou extensions kératocytaires reste dense et similaire. Le réseau est moins dense en zone postérieure, proche de l'endothélium.



**Figure 122** : Coupe CD34, cornées du lapin 8, OD: I-CXL à J7 ; OG: Témoin. Grossissement x20. Diminution nette de la densité des noyaux kératocytaires dans le stroma antérieur. En revanche, le marquage CD34 des membranes ou extensions kératocytaires reste dense, légèrement plus marqué du côté OD.

**c - Les tests d'innocuité** (Lapins N° 23 à 32)

Le tableau suivant récapitule le côté de l'œil examiné par SSI en fonction du lapin :

<b>N° Lapin</b>	<b>Côté examiné par SSI (Choix aléatoire)</b>
<b>23 (323507)</b>	D
<b>24 (323509)</b>	G
<b>25 (323542)</b>	G
<b>26 (323572)</b>	G
<b>27 (324644)</b>	D
<b>28 (324565)</b>	D
<b>29 (324629)</b>	D
<b>30 (325524)</b>	D
<b>31 (325527)</b>	G
<b>32 (325613)</b>	D

Le détail des épaisseurs mesurées en histologie avec le nombre de mitoses par coupes, les valeurs en rouge correspondent à l'œil examiné par SSI :

N° Lapin / œil	Epaisseur cornée $\mu\text{m}$	Mitoses
<b>23 OD</b>	<b>650</b>	<b>2</b>
OG	600	5
<b>24 OD</b>	500	5
OG	<b>650</b>	<b>3</b>
<b>25 OD</b>	600	2
OG	<b>630</b>	<b>4</b>
<b>26 OD</b>	720	6
OG	<b>750</b>	<b>4</b>
<b>27 OD</b>	<b>600</b>	<b>0</b>
OG	630	2
<b>28 OD</b>	<b>700</b>	<b>2</b>
OG	550	1
<b>29 OD</b>	<b>660</b>	<b>2</b>
OG	550	1
<b>30 OD</b>	<b>650</b>	<b>3</b>
OG	570	2
<b>31 OD</b>	<b>560</b>	<b>2</b>
OG	<b>610</b>	<b>3</b>
<b>32 OD</b>	<b>670</b>	<b>2</b>
OG	600	3
<b>Epaisseur moyenne</b>	<b>621,5</b>	<b>2,7</b>
<b>Ecart type</b>	<b>63,01</b>	<b>1,49</b>

Après confrontation entre les données du côté observé et les résultats histologiques fournis (**Cf. compte rendu détaillé fourni en annexe**) , l'analyse comparative œil examiné/œil non examiné montre les éléments suivants:

- **Cornée :**

L'histologie cornéenne fut retrouvée comme sensiblement normale pour tous les échantillons. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le côté observé et l'épaisseur de la cornée, le nombre de mitoses épithéliales semble paradoxalement légèrement plus important dans le groupe témoin.

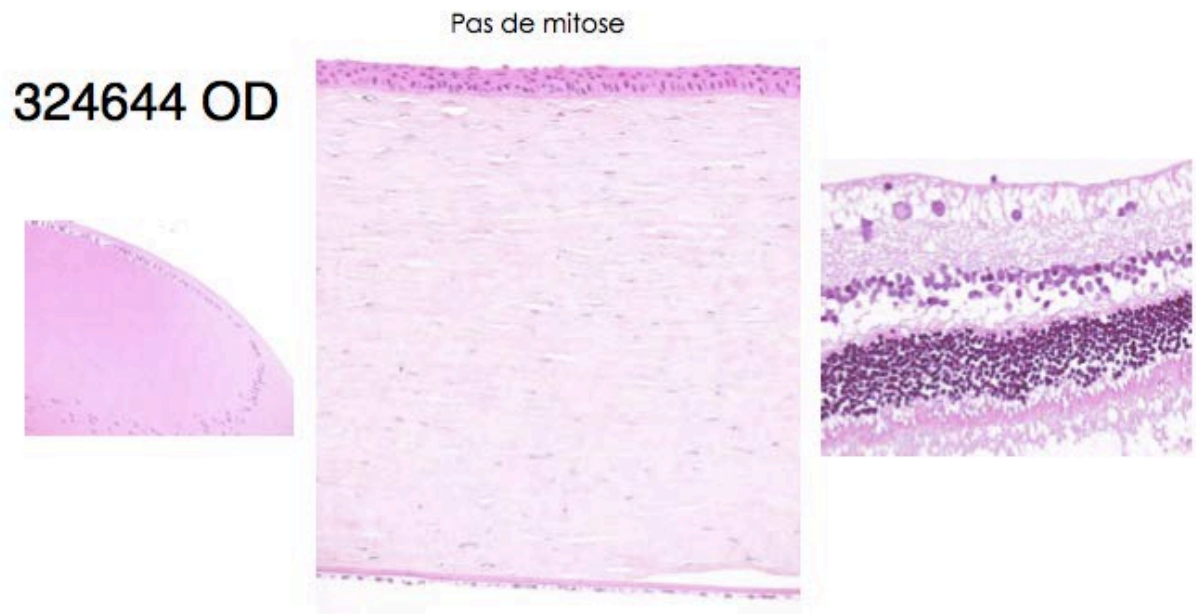
- **Cristallin :**

L'histologie cristallinienne fut retrouvée comme sensiblement normale pour tous les échantillons. Bien que le cristallin soit difficile à découper, il n'a pas été observé d'anomalie ou de différence significative entre œil témoin et œil observé. Le cristallin de l'OG du lapin 26 (SSI) n'a pu être découpé pour des raisons techniques.

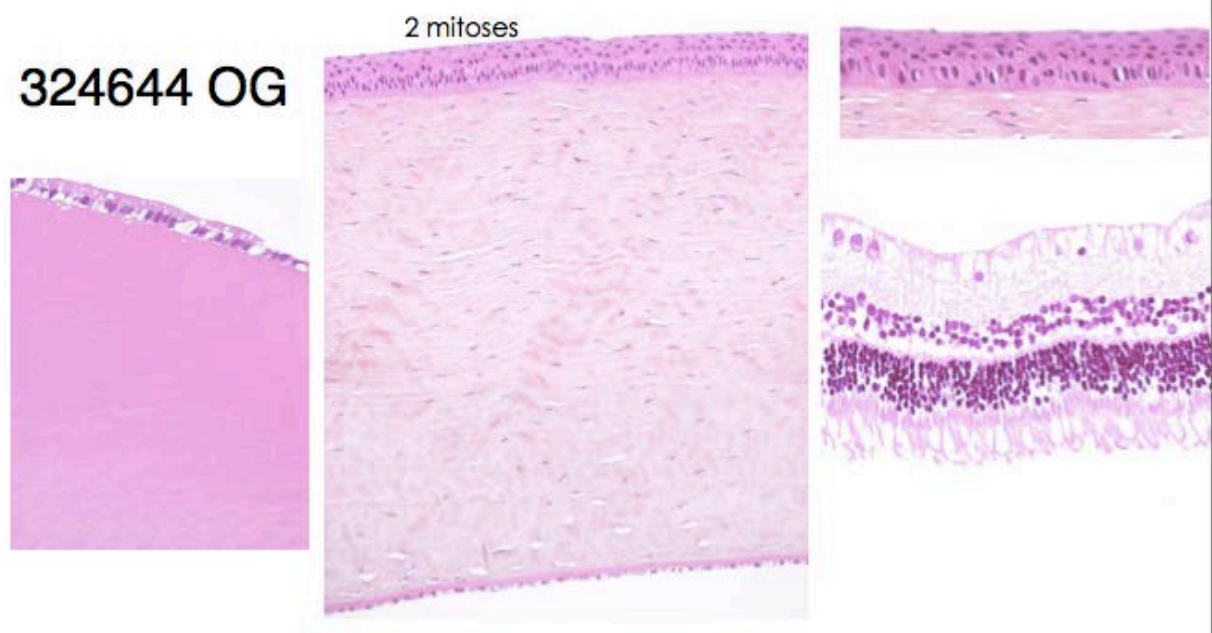
- **Rétine :**

L'histologie rétinienne fut retrouvée comme sensiblement normale pour tous les échantillons. Quelques polynucléaires éosinophiles choroïdiens ont pu être observés sur l'OD du lapin 23 (SSI).

Exemple de résultat histologique obtenu pour le lapin 27 (OD observé par SSI): **Cf. Figures 201-202.**



**Figure 123.**



**Figure 124.**

## IV - DISCUSSION

### 1- La transition de l'analyse du CXL *in vivo* vers l'analyse *ex vivo*

Les résultats de la première série de lapins a montré les limites du modèle animal et l'extrême distorsion entre les fluctuations liées aux variations de mise en contrainte du globe oculaire et les variations subtiles attendues après I-CXL. Les principaux facteurs susceptibles de biaiser les tests comparatifs sont résumés dans le tableau 'suivant, mentionnant aussi les éléments de compensation possibles *in vivo* et *ex vivo* :

Biais de mesure	Solution <i>in vivo</i>	Solution <i>ex vivo</i>
Troubles de la cicatrisation épithéliale	- CXL EPI-ON	NA
Taux d'hydratation de la cornée influençant la vitesse des ondes de cisaillement	- I-CXL	- I-CXL - Milieu de déturgescence adapté - Absence de délai entre énucléation et examen
Perte des conditions biomécaniques aux limites des cornées examinées	NA	- Réalisation d'un CXL sectoriel optimisé avec une mise en tension d'amplitude adaptée et constante
Variation de la PIO par fluctuation du tonus palpébral	- Obtenir un bon niveau d'endormissement	NA
Mouvements respiratoires limitant la précision de l'analyse des images	- Position sur le flanc	NA
Variation de la PIO par fluctuation du contact avec un écarteur mécanique	- Traction des paupières sans toucher au globe	NA
Variation de la PIO par compression variable du globe oculaire controlatéral au décours de l'examen du premier œil	- N'étudier qu'un seul œil à la fois sur la même période d'anesthésie générale	NA
Variation de la PIO par la succion du dispositif de iontophorèse	- Attendre plusieurs jours pour refaire une mesure en commençant par le même œil	NA

**Figure 125 :** Liste des biais de mesures identifiés *ex vivo* et *in vivo* dans notre étude et proposition des solutions correspondantes pour les limiter.

Il apparaît ainsi très clairement que l'observation *in vivo* du CXL réalisé *in vivo* est beaucoup plus complexe et plus biaisée que l'observation bien plus contrôlable réalisée en situation *ex vivo*.

Un autre aspect important, issu des premiers tests *in vivo*, fut de confirmer l'imprégnation effective du stroma cornée par iontophorèse, *primum movens* de toute réaction de photo-polymérisation. Les deux points forts de nos résultats furent les suivantes :

- La pénétration de riboflavine à travers l'épithélium du lapin est certaine et bien délimitée. Cependant, malgré 10 min d'application de champ électrique, elle n'est pas toujours homogène et on observe des variations de fluorescences évidentes d'un œil à l'autre. Il existait en particulier une plus grande densité d'imprégnation au niveau de la zone de contact de l'anneau succion en périphérie. Celle-ci est assez homogène sur 360°. Par ailleurs, il existait des points d'hyper-fluorescence de la riboflavine, de nombre et de taille variables, aléatoirement présents dans la zone centrale d'imprégnation. Les différents aspects de ces constatations sont discutés un peu plus bas.

- Le deuxième point important est la mise en évidence d'une déplétion en riboflavine lors du CXL sectoriel. Celle-ci fut bien visible avec une ligne de démarcation très nette située entre le secteur exposé et le secteur non exposé aux UV-A (zone d'atténuation relative de la fluorescence). Il y a bien eu ici une réaction chimique dite de « blanchiment » de la riboflavine au cours des essais, cette constatation est originale et ne fait pas l'objet de description dans la littérature.

Il faut préciser que les observations portant sur l'imprégnation de riboflavine dans le stroma sont, de principe, soumises à une caution concernant le comportement de l'épithélium vis à vis de la riboflavine. En effet, nous ne savons pas, en particulier, si l'épithélium est capable de concentrer une quantité significative de riboflavine pouvant masquer l'interaction avec le stroma sous jacent. Notamment, en plus de sa valeur intrinsèque d'absorption des UV-A sans riboflavine,<sup>25</sup> un phénomène de passage intracellulaire de riboflavine, favorisé par le champ électrique, a déjà été décrit dans la littérature pour la iontophorèse sous le concept d'électroporation.<sup>26</sup> La valeur d'absorption des UV-A par l'épithélium après iontophorèse n'a pas été étudié mais nécessiterait une procédure expérimentale de mesure en transmission après iontophorèse, comparant les valeurs de transmission avec ou sans le retrait de

l'épithélium. Le protocole de I-CXL pourrait être secondairement ajusté en fonction des résultats. Eventuellement par exemple augmentation de la dose des UV-A soit en intensité, soit en durée d'UV-A.

## 2- Effets du I-CXL sur la courbe de pression/élasticité

L'élasticité de la cornée du lapin est fortement liée à la mise en tension du tissu, seul les tests d'inflation de pression, difficilement réalisables *in vivo*, permettent de mettre en évidence les modifications biomécaniques induites par le CXL. La mesure du durcissement lié au I-CXL n'est pas possible *in vivo* car la PIO du lapin est trop basse ou trop fluctuante pour permettre de révéler les modifications subtiles de comportement biomécanique de la cornée induites par le I-CXL. Dans notre expérience, ces dernières sont révélées uniquement *ex vivo* sur une plage de PIO comprises entre 25 mmHg et 50 mmHg. Ainsi, les cornées ayant subi un I-CXL *in vivo* puis, après euthanasie, immédiatement montées *ex vivo* sur CAA, révèlent une hausse modeste en élasticité absolue mais leur cinétique de durcissement est significativement modifiée par rapport à celle de l'œil controlatéral non traité (élasticité relative). La courbe de contrainte (PIO) versus dureté (E) montre une accentuation moyenne d'un facteur 1,6 de la pente de la courbe de régression linéaire, observée entre l'œil traité par I-CXL et à l'œil témoin ( $p=0.029$ ). Le seuil de significativité était majoré après 40 mmHg, ce qui confirme le comportement non-linéaire de la biomécanique cornéenne mais aussi de l'efficacité non-linéaire du CXL. La cornée humaine étant réputée plus rigide que celle du lapin, et son épithélium étant lui aussi probablement plus perméable, il est possible que le durcissement effectif de la cornée soit plus important après I-CXL chez l'homme. A notre connaissance, il n'existe pas de description claire de cette notion de non-linéarité de l'élasticité après T-CXL par test d'inflation. La seule étude reprenant des conditions expérimentales similaires aux nôtres, fut l'étude Armstrong et al, sur le lapin *in vivo*, utilisant l'élastographie OCT avec un T-CXL par adjonction de chlorure de benzalkonium. Il ne donne cependant pas les détails des valeurs d'élasticité mesurées. Il note néanmoins un durcissement relatif de 3,7 à 2 mois post CXL.<sup>27</sup>



### 3 - Effets du I-CXL sur l'anisotropie cornéenne

#### a - Considérations générales

Les cornées ayant subi un I-CXL sectoriel (supérieur) *in vivo* puis immédiatement montées sur CAA après euthanasie révèlent une majoration de l'anisotropie haut/bas par rapport à celle de l'œil controlatéral non traité. Avec ce protocole d'anisotropie nous tendons à démontrer l'effet isolé et quasi instantané du CXL sur un modèle lapin, traité *in vivo*. Ce dernier est modeste mais permet d'affirmer qu'il ne s'agit pas d'un biais lié à l'abrasion épithéliale, la déshydratation, les fluctuations de pression ou la préparation des échantillons. La cornée traitée en mode sectoriel est ici son propre témoin.

#### b - Cartographies d'élasticité

Nous n'avons pas pu observer une cartographie de durcissement parfaitement en accord avec le I-CXL sectoriel réalisé. Il est probable que l'inhomogénéité de l'imprégnation ait diminué la sensibilité du test d'irradiation sectoriel. De plus, l'alignement entre la sonde et la partie supérieure du secteur irradié souffrait aussi d'imperfections car était réalisé en immersion avec un champ d'observation réduit. Par ailleurs, nous aurions peut être pu observer un anneau de durcissement plus fort entre 8 et 9 mm de diamètre correspondant à la zone de renforcement de l'imprégnation. Cependant, en raison de la courbure cornéenne assez prononcée chez le lapin, l'onde de cisaillement ne fut visible correctement que sur un diamètre de 5 à 6 mm autour de l'axe de révolution de la sonde. Si celle-ci fut assez bien centrée sur le centre des cornées, elle le fut moins efficacement sur le centre de la zone traitée, l'anneau de succion n'étant pas toujours positionné au centre de la cornée en raison des contraintes de mise en place *in vivo* de ce dernier (troisième paupière, glissement oculaire).

#### c - Courbes d'anisotropie

Le renforcement relatif de la dureté dans l'axe haut/bas démontre une certaine efficacité du I-CXL mais montre surtout qu'il est possible de sensibiliser le modèle expérimental en réalisant un CXL sectoriel. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'approche similaire, hormis dans notre article sur les cornées porcines.<sup>28</sup> Les conclusions de ces tests d'anisotropie sont

cependant à confirmer avec une méthodologie d'alignement encore plus rigoureuse et peut être un balayage non plus radiaire de la cornée mais plutôt linéaire, de haut en bas par exemple, en corrigeant l'incidence de la barrette échographique par inclinaison relative.

#### **4 - Limitations de l'étude**

##### **a - Variations de l'épaisseur cornéenne**

La variation de l'épaisseur cornéenne pendant les expérimentations est reconnue comme et le témoin indirect des variations d'hydratation du tissu mais aussi comme un biais d'imagerie. Les lois de la propagation des ondes élastiques stipulent bien que plus le tissu est épais plus la dureté est surestimée.<sup>29</sup> Fort heureusement, nos résultats ont pu démontrer l'absence de fluctuation significatives de l'épaisseur cornéenne centrale au cours des expériences, la cornée ayant été maintenue dans un milieu de déturgescence adapté et, surtout, ayant conservé son épithélium pendant des durées d'examen post mortem relativement courtes. Les mesures ont ainsi démontré par pachymétrie à US (résolution 20 to 30 microns), une moyenne de 399 microns pour les cornées avec CXL versus 400 microns pour les cornées témoins. Malheureusement, la résolution axiale de la sonde échographie en mode B estimée à 100 - 150  $\mu\text{m}$  pour une fréquence de 15 MHz, n'a pas permis de visualiser précisément les épaisseurs en moyennes au niveau réel des coupes mesurées en élastographie et, en particulier, en moyenne périphérie.

##### **b - Contraintes liées à l'élastographe**

En terme de qualité d'imagerie, quand la pression d'inflation augmente, le champ d'analyse cartographique de l'élasticité diminue. Ce phénomène peut s'expliquer à deux niveaux:

Les valeurs d'élasticité ne sont affichées par le logiciel uniquement si la qualité du signal dépasse un seuil de corrélation supérieur à 0,9 (algorithme de temps de vol). Ce seuil est altéré par la diminution du ratio entre l'amplitude des ondes de cisaillement (qui décroissent en fonction de leur propagation) et du bruit de fond (rapport signal /bruit). Quand la pression augmente, la cornée devient plus dure et donc moins déformable induisant une diminution des amplitudes des ondes de cisaillement. Consécutivement, la zone compatible pour une analyse élastographique est réduite de la périphérie vers le centre de l'image. Ceci est bien illustré sur

la **Figure 177**, le champ d'examen passant d'environ 8 mm pour une pression de 10 mmHg à 1 mm pour une pression de 60 mmHg.

Comme démontré par Nguyen et al, la cornée peut être considérée comme une plaque en immersion liquide.<sup>30</sup> Dans cette configuration géométrique, les ondes de cisaillement sont alors guidées et leur atténuation est principalement reliée à l'épaisseur de la cornée et à sa courbure. Ainsi, quand la pression augmente, la courbure augmente sensiblement et les poussées ultrasoniques deviennent de moins en moins parallèle à la surface de la cornée, induisant une perte croissante d'efficacité mécanique pour génération des ondes de cisaillements. De plus, l'algorithme d'analyse du temps de vol actuel utilise des filtres directionnels qui pistent préférentiellement les ondes perpendiculaires à l'axe de poussée des US. Comme l'onde de cisaillement est guidée par la géométrie cornéenne, quand la courbure augmente, l'onde de cisaillement elle aussi, se propage de moins en moins parallèlement à la surface. Cet artéfact de mesure, implicite au système, devrait faire l'objet de raffinement des algorithmes d'analyse des temps de vol dans les prochaines versions de l'élastographe cornéen.

Par ailleurs, l'épaisseur du tissu peut lui aussi jouer un rôle dans la conversion de la vitesse de l'onde en valeur d'élasticité. En effet, la cornée se comporte comme un guide d'onde, les faces antérieure et postérieure confinent la propagation des ondes dans un mode dit « guidé », correspondant au cas des ondes de Lamb. En accord avec l'équation des ondes de Lamb, plus la cornée est fine, le plus les ondes seront contraintes et donc ralenties.<sup>31</sup> Ainsi la cornée apparaîtra plus molle. Malencontreusement, la résolution axiale de la sonde 15kHz utilisée a une résolution de 100 à 150 microns, limitant l'analyse de variations fines de la pachymétrie cornéenne. Cependant, nous avons pu suivre l'évolution de l'épaisseur centrale et constaté peu de changement au cours des essais et en particulier une grande similarité entre les yeux traités et leurs témoins respectifs.

### **c - Contraintes liées à la iontophorèse**

La iontophorèse cornéenne est une technologie récente, elle dérive de nombreux travaux réalisés sur la iontophorèse trans-sclérale. Il y a très peu de travaux traduisant des résultats pour la iontophorèse de la riboflavine. Nous avons pu récupérer certains posters de l'ARVO,

illustrant l'innocuité (Roy, Patane, Manzo et al) <sup>32-34</sup> et l'efficacité (Soler et al) <sup>35</sup> du passage de la riboflavine assisté par iontophorèse dans la cornée de lapins (**Posters mis en Annexes**).

Il a bien été constaté sur les cornées exposées aux UV-A, une très nette fluorescence verte de la zone ayant bénéficié de la iontophorèse, contrastant fortement avec la zone périphérique dont la fluorescence finement bleutée correspond à l'absorption des UV-A par le collagène. Cette zone étant exempte de riboflavine, l'émission bleue du collagène n'est pas absorbée par le pic d'absorption dans le bleu de la riboflavine, et n'est pas masquée par son émission dans le vert. **Cf. Chapitre 1.** Enfin, il a été constaté sur les tests d'anisotropie une consommation évidente de la fluorescence dans la partie exposée aux UV-A, en comparaison de la partie non exposée. La riboflavine était donc bien absorbée, stockée puis consommée par les UV-A au sein du stroma cornée. Comme expliqué plus haut, n'ayant qu'une approche par visualisation de dessus, nous ne pouvons pas strictement exclure un certain niveau de concentration de riboflavine dans l'épaisseur de l'épithélium. Nous ne doutons cependant pas du passage de la riboflavine dans le stroma par iontophorèse trans-épithéliale (voie inter-cellulaire), néanmoins, la question de l'électroporation (voie intra-cellulaire) dans les cellules épithéliales resterait, de principe, à explorer.

Nos résultats ont aussi mis en évidence un certain niveau d'inhomogénéité de la fluorescence de la cornée observée après iontophorèse, lors des UV-A. Un renforcement systématique au niveau du contact de l'anneau de succion et des petites zones de quelques millimètres de diamètre aléatoirement positionnées dans le champ de la surface de iontophorèse. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces inhomogénéités:

- Lésions iatrogènes de l'épithélium entraînant un passage facilité de la riboflavine

- Par manipulation traumatique avant la phase des UV-A: ce fut peu probable, les animaux étaient immédiatement positionnés sur le flanc en commençant par l'œil devant bénéficier du I-CXL, sans utiliser d'écarteur. L'anneau de succion de la iontophorèse était facilement positionnable. Les mesures au pachymètre contact à US étaient réalisées sans appuis traumatique et toujours au centre.
- Par dessiccation pendant la iontophorèse: la phase d'expérimentation précédant les UV-A était essentiellement réalisée en atmosphère aqueuse durant la iontophorèse. L'observation des zones d'hyper-fluorescence était présente dès le

début des UV-A, eux même pratiqués immédiatement après la phase de iontophorèse.

- Par modification des conditions physiques de la riboflavine : l'électrolyse de la solution de riboflavine induirait un changement significatif du pH si la solution n'était pas tamponnée. L'élévation de température était certainement possible mais négligeable, Manzo et al l'avaient démontré au sujet d'un dispositif trans-scléral.<sup>34</sup>

**Cf. poster ARVO, mis en annexe.** Les variations d'osmolarité sont possibles mais nous n'avons pas constaté de forte variation de pachymétrie entre avant et après la phase de iontophorèse.

- Inhomogénéité du champ électrique poussant de manière inégale la riboflavine dans le stroma : cette éventualité est peu probable compte tenu des spécifications physiques du dispositif.

- Inhomogénéité de l'épithélium du lapin: l'épithélium du jeune lapin (2 à 3 kg) a une épaisseur comparable à celle de l'homme mais son stroma est notablement plus fin (d'environ 20 à 25%). Comme chez l'homme, il est plus fin au centre qu'en périphérie. Le centre est donc plus facilement perméable. Cependant, les zones d'hyper-fluorescence ne furent pas systématiquement retrouvées au centre et furent multiples. L'épithélium du lapin, contrairement à celui de l'homme, ne dispose pas de membrane basale d'ancrage de l'épithélium bien individualisé, ceci peut éventuellement entraîner une disparité de perméabilité semble très adhérent par rapport à l'humain. Le fait qu'une hyper-fluorescence soit aussi systématiquement retrouvée au niveau du contact avec l'anneau de succion indique que celle-ci est possiblement la conséquence d'une contrainte biomécanique sur l'épithélium. Le renforcement en anneau périphérique serait peut être du à la succion qui dégrade localement la cohésion épithéliale et favorise le passage de la molécule sans pour autant entraîner d'ulcération visible. Une analyse des jonctions épithéliales en microscopie électronique à transmission serait utile pour élucider cette inhomogénéité de perméabilisation sur ce modèle lapin.

Par ailleurs, un défaut de rinçage de la riboflavine est peu probable mais pourrait entraîner une hyper-fluorescence localisée, la présence de Fluorescéine résiduelle est moins probable car cette dernière absorbe très peu à 375 nm, elle peut toutefois réaliser un masquage relatif de l'émission verte de la riboflavine car elle présente un petit pic d'absorption dans le vert (**Cf. spectres d'émission de la riboflavine et de la Fluorescéine mis en Annexe**).

Finalement, dans notre protocole, nous avons choisi de publier les essais avec une procédure de iontophorèse de 10 minutes et non pas 5 minutes à 1 mA comme initialement recommandé par le constructeur pour l'application chez l'homme. Ce choix fut dicté par l'observation des zones inhomogènes et la volonté d'obtenir une concentration suffisante de riboflavine dans le stroma pour induire un durcissement significatif. Une procédure de titrage de la durée de la iontophorèse et de la dose des UV-A est à envisager à l'occasion des prochaines expérimentations.

## **5 - Résultats histologiques**

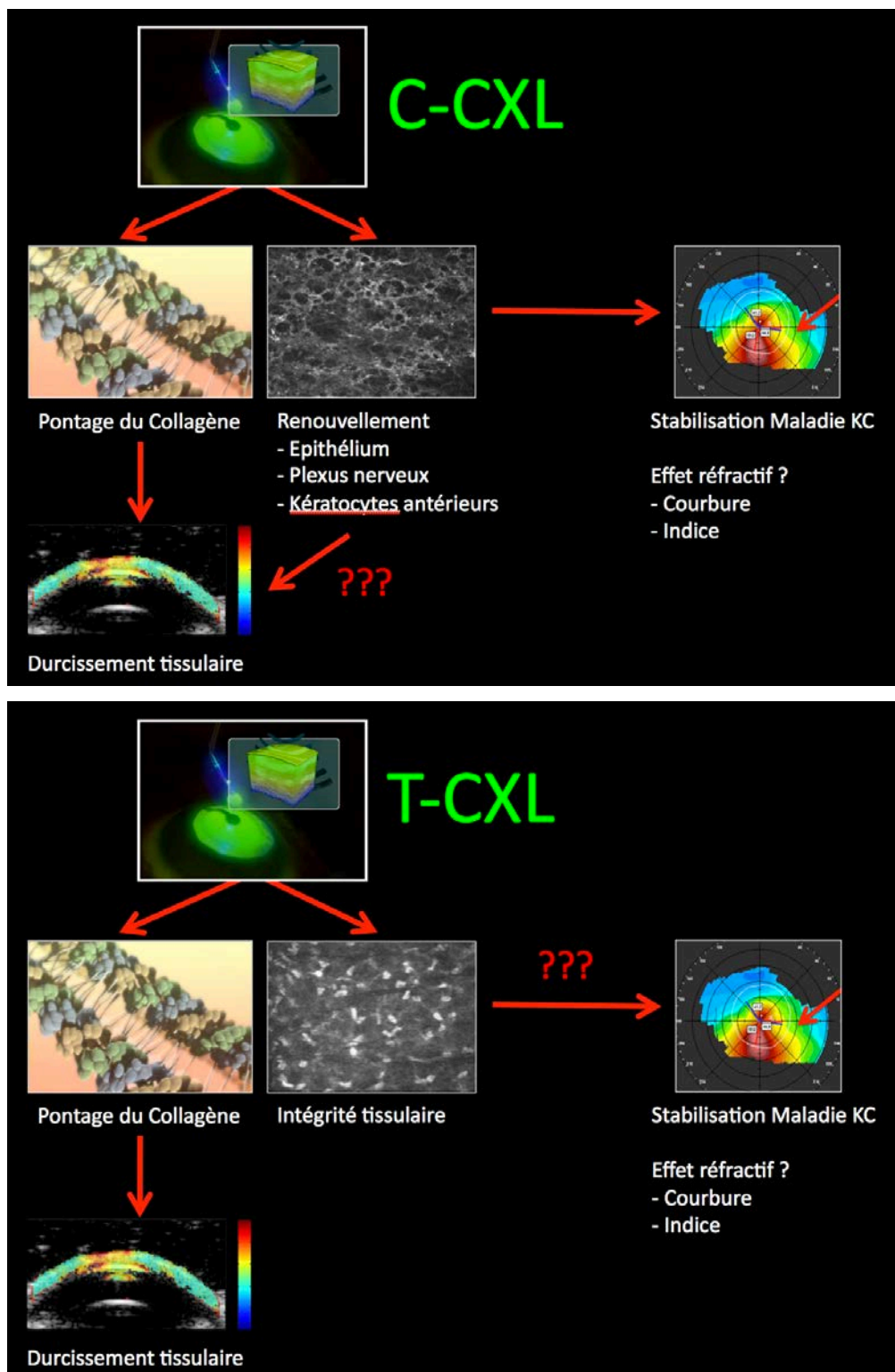
### **a - C-CXL**

La disparition des kératocytes est clairement établie après C-CXL (EPI-OFF) et concerne les deux cornées traitées par C-CXL. Le lapin 3 a certainement subi une lésion endothéliale partielle et présenté un déficit de cicatrisation épithélial majeur. Le lapin 2 montre bien un certain niveau de compaction tissulaire (majoration des fentes claires). Comme discuté plus haut, l'aléas de cicatrisation est certainement fort sur le modèle lapin suivant un CXL EPI-OFF.

### **b - I-CXL**

Seule la cornée du lapin 8 a montré une perte franche des kératocytes. La dose ayant été doublée, il est probable que le seuil de cytotoxicité fut atteint uniquement pour ce cas. Pour les autres cas de I-CXL, les kératocytes n'ont pas disparu, ce qui ne signifie pas pour autant l'absence de durcissement de la cornée. La question de l'intérêt de la dépopulation kératocytaire dans le processus de CXL est une question entière, non documentée clairement dans la littérature. Le lien entre la perte kératocytaire, bien visible en microscopie confocale, le durcissement cornéen visible par élastographie et l'efficacité clinique, n'est pas établi.

Un appareil d'élastographie clinique permettrait de faire le lien et de savoir si l'efficacité clinique du CXL repose sur la polymérisation du collagène ou si c'est plutôt le renouvellement cellulaire (plexus nerveux, kératocytes, épithélium) qui entraîne l'effet clinique et éventuellement biomécanique aussi. Les deux mécanismes n'étant pas exclusifs. L'illustration suivante résume cette problématique (**Cf. Figure 126**).



**Figure 126** : Hypothèses de fonctionnement relationnel entre le durcissement, le statut cellulaire et l'effet clinique pour le C-CXL (haut), comparé au T-CXL (bas), trans-épithélial. Illustration D Touboul.

### c – Innocuité

Pour l'ensemble des échantillons regardés, il n'a pas été retrouvé d'anomalies pouvant faire évoquer un mécanisme lésionnel dans la cornée, le cristallin ou la rétine des lapins. Aucun signe de dilacération acoustique ni de dénaturation thermique. En particulier pas de signe d'apoptose cellulaire plus évident du côté examiné versus non examiné. L'analyse histologique est cependant limitée par la réalisation d'une coupe axiale unique réalisée par globe, pouvant passer à côté d'une zone anormale. L'absence de lésion sur une cohorte de 10 coupes est cependant un élément très rassurant, plaidant en faveur d'une innocuité totale des mesures élastographiques effectuées.

### 4 - Réflexion sur le fonctionnement du CXL et perspectives d'amélioration du modèle expérimental

Nos résultats montrent assez clairement qu'il existe une certaine efficacité du I-CXL *in vivo* pour durcir immédiatement la cornée, par photo-polymérisation ou photo-réticulation, mesurable par SSI, dans les limites de notre modèle expérimental. Néanmoins, il reste à démontrer que cet effet est pérennisable dans le temps et correspond bien au phénomène de freination des ectasies cornéennes retrouvé dans la pratique clinique. Autrement dit, nous ne savons pas bien si le CXL freine le KC grâce à son action instantanée (et pérenne ?) sur la photo-polymérisation du collagène ou s'il ne s'agit pas plutôt d'un processus de cicatrisation impliquant le renouvellement cellulaire de l'épithélium, des plexus nerveux et surtout des kératocytes (les deux processus pouvant éventuellement cohabiter). L'activation des kératocytes pourrait, par exemple, renforcer l'ancrage des fibres de collagène dans la membrane de Bowman, stimuler la création d'un nouveau réseau de connexions intercellulaires plus favorable au soutien des lamelles stromales, etc.<sup>36-37</sup>

Dans cet optique, l'évaluation du T-CXL est très instructif car élimine certains facteurs confondants pour le raisonnement autour de l'effet isolé de la photo-polymérisation du collagène stromal. En effet, avec ce modèle, les problématiques de lésions épithéliales et plexulaires, de cicatrisation secondaires et d'homéostasie cornéenne sont mises à distance.

Alors que le principe de photo-polymérisation représente, depuis le début du CXL, le principal argument développé pour expliquer le mode d'action de la procédure, il est



intéressant de souligner qu'il n'existe que deux articles expérimentaux publiés, dont un seul en langue anglaise, étudiant véritablement l'effet biomécanique du CXL dans le temps. Le premier fut publié par Spoerl et al en 2000, portant sur l'extensométrie de 16 yeux de lapins avec une chronologie de sacrifices à 1 mois (n=11) et à 3 mois (n=8).<sup>38</sup> Le second fut publié par Wollensak et al en 2009, portant sur 9 lapins sacrifiés à 1, 2 et 3 mois post-CXL (n=3 pour chaque période).<sup>39</sup> Plus récemment, Ford et al ont décrit une technique d'élastographie par analyse du speckle par OCT qui pourrait être un bon candidat pour le suivi longitudinal des CXL réalisés *in vivo*.<sup>40</sup> La technologie Brillouin semble aussi être un axe prometteur.<sup>41</sup>

De nombreuses études sur les effets microstructuraux du CXL ont été publiées mais la corrélation entre les modifications de structure et les propriétés biomécaniques sont mal établies et toujours réalisées en condition *ex vivo*.<sup>42-43</sup> Malheureusement, à ce jour, il n'y a donc pas de solution non invasive pour suivre cliniquement les changements architecturaux du collagène dans le temps. Avec le futur avènement de différentes approches pour faire de l'imagerie de collagène *in vivo* (ex : imagerie par génération de seconde harmonique - SHG), le domaine d'expertise de l'élastographie dynamique apparaît comme une voie particulièrement pertinente et aidera à mieux décortiquer les mécanismes intimes du CXL.<sup>44</sup>

Nous pensons donc que la technologie d'élastographie cornéenne par SSI devrait pouvoir trouver sa place dans un projet de transfert technologique visant la mise sur le marché d'un dispositif médical capable de détailler la biomécanique cornéenne des patients à un niveau de sensibilité correspondant aux besoins des cliniciens. Les considérations portant sur ce développement seront détaillées dans le **Chapitre 4**.

## V - CONCLUSION DU CHAPITRE 3

La technologie SSI est certainement une des technologies les plus aboutie pour obtenir une véritable quantification physique du CXL *in vivo*. Sa sensibilité, bien illustrée avec les tests d'inflation de pression et d'anisotropie réalisés, semble compatible avec l'enregistrement de variations subtiles de la biomécanique cornéenne, vraisemblablement observées lors du CXL.

Cependant, avant de passer sur les essais cliniques, un modèle animal robuste est nécessaire pour prouver l'innocuité et vérifier la pertinence du développement. Ce dernier est complexe à mettre en œuvre *in vivo* car l'élasticité est très liée à plusieurs paramètres difficiles à contrôler précisément *in vivo*, tels que: l'épaisseur cornéenne, la cicatrisation et les causes de fluctuations diverses de la PIO. Les deux premiers paramètres sont contournables en choisissant un CXL les impliquant peu, comme le CXL assisté par iontophorèse (I-CXL). En revanche, la PIO, indissociable de la variation de l'élasticité, est un paramètre très variable selon les modalités expérimentales : la position de l'animal, le débit cardiaque, le niveau d'endormissement, la tension palpébrale, la compression du globe, la pose d'un anneau de succion). Il est donc préférable de réaliser le traitement *in vivo* puis de sacrifier l'animal pour monter la cornée sur une chambre antérieure artificielle (CAA) afin de contrôler précisément la PIO. Dans ces conditions, la pachymétrie peut toutefois varier mais influence moins le module élastique que les fluctuations de PIO, l'utilisation d'un milieu de déturgescence adapté permet de limiter ces variations au mieux suivies avec l'aide d'une imagerie de l'épaisseur cornéenne.

Enfin, le protocole expérimental nécessite un témoin non traité, si possible l'œil controlatéral. Cependant, la symétrie biomécanique de l'animal n'est pas certaine, et le montage de la cornée *ex vivo* sur CAA peut induire un biais de comparaison entre les deux yeux. L'approche la plus fine est sans doute la réalisation d'un CXL dit « sectoriel », comme réalisé précédemment par notre équipe avec le CXL conventionnel, où la cornée traitée est son propre témoin, limitant ainsi les biais liés aux fluctuations de l'hydratation cornéenne et de la PIO. De plus, l'analyse de l'anisotropie par rotation de la sonde échographique autour de l'axe passant par l'apex cornéen, permet alors de rechercher, à pression d'inflation et pachymétrie constantes, les disparités de dureté

**entre la zone traitée et la zone non traitée. Dans ce mode opératoire, les variations biomécaniques subtiles du CXL ne seront révélées que sur une plage favorable de mise en tension du tissu qu'il faut définir par tâtonnement et répétitions.**

**Enfin, c'est sur cette base d'expérimentations, que notre série préliminaire de 22 lapins traités par I-CXL a permis de démontrer la pertinence de la technologie SSI pour quantifier l'effet du CXL et de comprendre différents mécanismes utiles à considérer en vue d'une approche clinique de la mesure de l'élasticité cornéenne.**

## VI – Bibliographie

1. Gkika M, Labiris G, Kozobolis V. Corneal collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A irradiation: a review of clinical and experimental studies. *International Ophthalmology*. 2011; 31; 4: 309–319.
2. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/Ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*. 2003; 135; 5: 620–627.
3. Hennighausen, H., Feldman, S. T., Bille, J. F., & McCulloch, a D. (1998). Anterior-posterior strain variation in normally hydrated and swollen rabbit cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(2), 253–62.
4. Koppen C, Wouters K, Mathysen D, Rozema J, Tassignon MJ. Refractive and topographic results of benzalkonium chloride-assisted transepithelial crosslinking. *Journal of cataract and refractive surgery*, 2012. 38(6), 1000–5.
5. Touboul D, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal Confocal Microscopy Following Conventional, Transepithelial, and Accelerated Corneal Collagen Cross-linking Procedures for Keratoconus. *Journal of refractive surgery*. 2012. 28(11), 769–76.
6. Soler V. Iontophoresis transcorneal delivery technique for transepithelial corneal collagen crosslinking with riboflavin in a rabbit model. Poster ARVO 2013, 3, 4299.
7. Koppen, C., Gobin, L., & Tassignon, M.-J. (2010). The absorption characteristics of the human cornea in ultraviolet-a crosslinking. *Eye & contact lens*, 36(2), 77–80.
8. Werner, L., Chew, J., & Mamalis, N. (2006). Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. *Veterinary ophthalmology*, 9(5), 281–91.
9. Costello C, Jeske AH. Iontophoresis: Applications in transdermal medication delivery. *Phys Ther* 1995;75:554-63.
10. Von Sallmann L. Iontophoretic introduction of atropine and scopolamine into the rabbit eye. *Arch Ophthalmol* 1943;29:711–9.
11. Jones RF, Maurice DM. New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp Eye Res* 1966;5:208–20.
12. Hughes L, Maurice DM. A fresh look at iontophoresis. *Arch Ophthalmol* 1984;102:1825–9.
13. Lam TT, Edward DP, Zhu XA, Tso MO. Transscleral iontophoresis of dexamethasone. *Arch Ophthalmol* 1989;107:1368–71.
14. Behar-Cohen F, Parel JM, El Aouni A, Chauvaud D. Iontophorèse : revue de la littérature et perspectives. *J Fr Ophtalmol* 2001 ;24 :319-27.
15. Savoldelli M, Parel JM, D'Hermie F, Kasner L, Pouliquen Y, de Kozak Y, Behar-Cohen F. An histologic and ultrastructural study of the rat and the rabbit eye after iontophoresis. *ARVO. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:S927.
16. Behar-Cohen F, Parel JM, Pouliquen Y, Thillaye-Goldenberg B, Goureau O, Heydolph S, Courtois Y, De Kozak Y. Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced-uveitis in rats. *Exp Eye Res* 1997;65:533-45.

17. Chauvaud D, Behar-Cohen F, Parel JM, Renard G. Transscleral iontophoresis of corticosteroids: Phase II Clinical Trial. *ARVO Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:S79.
18. Yoo SH, Dursun D, Dubovy S, et al. Iontophoresis for the treatment of *Paecilomyces* keratitis. *Cornea* 2002;21:131–2.
19. Parkinson T, Ferguson E, Febbraro S, et al. Tolerance of ocular iontophoresis in healthy volunteers. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003;19:145–51.
20. Horwath-Winter J, Schmut O, Haller-Schober EM, et al. Iodide iontophoresis as a treatment for dry eye syndrome. *Br J Ophthalmol* 2005;89:40–4.
21. Behar-Cohen FF, El Aouni A, Gautier S, et al. Transscleral Coulomb-controlled iontophoresis of methylprednisolone into the rabbit eye: influence of duration of treatment, current intensity and drug concentration on ocular tissue and fluid levels. *Exp Eye Res* 2002;74:51–9.
22. Eljarrat-Binstock E, Orucov F, Frucht-Pery J, Pe'er J, Domb AJ. Methylprednisolone delivery to the back of the eye using hydrogel iontophoresis. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008;24:344–50.
23. Patane MA, Cohen A, From S, Torkildsen G, Welch D, Ousler GW 3rd. Ocular iontophoresis of EGP-437 (dexamethasone phosphate) in dry eye patients: results of a randomized clinical trial. *Clin Ophthalmol* 2011;5:633–43.
24. Cohen AE, Assang C, Patane MA, From S, Korenfeld M; Avion Study Investigators. Evaluation of dexamethasone phosphate delivered by ocular iontophoresis for treating noninfectious anterior uveitis. *Ophthalmology* 2012 119:66–7.
25. Xiangchen T, Haiqun Y, Yong Zhang, Zhiwei L, Vishal J, Shouxiang N, Ya W and Guoying M. Role of Corneal Epithelium in Riboflavin/Ultraviolet-A Mediated Corneal Cross-linking. Treatment in Rabbit Eyes. *BioMed research international*. 2013; 624563: 1–6.
26. Banga AK, Bose S, Ghosh TK. Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts. *International journal of pharmaceutics*, 1999; 179; 1: 1–19.
27. Armstrong BK, Lin MP, Ford MR, Santhiago MR, Singh V, Grossman GH, et al. Biological and biomechanical responses to traditional epithelium-off and transepithelial riboflavin-UVA CXL techniques in rabbits. *Journal of refractive surgery*. 2013; 29; 5: 332–341.
28. Nguyen, T.-M., Aubry, J.-F., Touboul, D., Fink, M., Gennisson, J.-L., Bercoff, J., & Tanter, M. (2012). Monitoring of Cornea Elastic Properties Changes during UV-A/Riboflavin-Induced Corneal Collagen Cross-Linking using Supersonic Shear Wave Imaging: A Pilot Study. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(9), 5948–54.
29. Brum J, Gennisson L, Nguyen TM, Benech N, Fink M, Negreira C. Application of 1-D transient elastography for the shear modulus assessment of thin-layered soft tissue: comparison with Supersonic Shear Imaging technique. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*. 2012. 59 ; 4 : 703–714.
30. Nguyen TM, Couade M, Bercoff J, Tanter M. Assessment of viscous and elastic properties of sub-wavelength layered soft tissues using Shear Wave Spectroscopy: theoretical framework and in vitro experimental validation”, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*. 2011. 58; 11: 2305–2315.
31. Nguyen TM, Couade M, Bercoff J, Tanter M. Assessment of viscous and elastic properties of sub-

- wavelength layered soft tissues using Shear Wave Spectroscopy: theoretical framework and in vitro experimental validation", IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control. 2011; 58; 11: 2305-2315.
32. Roy P, Elena P.P, Viaud K, Caillaud T, Calias P. Ocular Tolerability of Iontophoresis. 2007; Poster ARVO 5800.
  33. Patane M.A, Blalock T, Sanford T. et al. Ocular safety assessment of high iontophoretic current applied to rabbit eyes. 2009; ARVO Poster 5982.
  34. M. Manzo et al. Transcleral iontophoresis does not affect ocular temperature in rabbits. ARVO Poster 6001.
  35. Soler V.J et al. Iontophoresis transcorneal delivery technique for transepithelial corneal collagen crosslinking with riboflavin in a rabbit model. 2013; Poster ARVO 4299.
  36. Mazzotta C, Caporossi T, Denaro R, Bovone C, Sparano C, Paradiso A, Baiocchi S, et al. Morphological and functional correlations in riboflavin UV-A corneal collagen cross-linking for keratoconus. *Acta ophthalmologica*. 2012; 90; 3: 259-265.
  37. Touboul D, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal Confocal Microscopy Following Conventional, Transepithelial, and Accelerated Corneal Collagen Cross-linking Procedures for Keratoconus. *Journal of refractive surgery*. 2012; 28; 11: 769-776.
  38. Spörl E, Schreiber J, Hellmund K, Seiler T, Knuschke P. Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen. *Ophthalmologie*. 2000; 97: 203-220.
  39. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta ophthalmologica*. 2009; 87; 1: 48-51.
  40. Ford MR, Dupps WJ, Rollins AM, Roy AS, Hu Z. Method for optical coherence elastography of the cornea. *Journal of biomedical optics*. 2011; 16; 1: 016005.
  41. Scarcelli, G., Kling, S., Quijano, E., Pineda, R., Marcos, S., & Yun, S. H. (2013). Brillouin microscopy of collagen crosslinking: noncontact depth-dependent analysis of corneal elastic modulus. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(2), 1418–25.
  42. Ford MR, Dupps WJ, Rollins AM, Roy AS, Hu Z. Method for optical coherence elastography of the cornea. *Journal of biomedical optics*. 2011; 16; 1: 016005.
  43. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen by riboflavin/UVA. *Cornea*. 2004; 23; 5: 503-507.
  44. Bueno JM, Gualda EJ, Giakoumaki A, Pérez-Merino P, Marcos S, Artal P. Multiphoton microscopy of ex vivo corneas after collagen cross-linking. *Investigative ophthalmology and visual science*. 2011; 52; 8: 5325-5331.

## **Chapitre 4**

### **Perspectives du transfert technologique de l'élastographie cornéenne par SSI pour les applications cliniques**

---

#### **Sommaire**

I - Introduction.....	258
II - Innocuité de la sonde élastographique.....	259
III - Réalisation d'une interface œil/machine compatible.....	262
IV - Méthodologie de l'examen sur œil humain.....	267
V - Conclusions du chapitre.....	269

## I – Introduction

L'évaluation de la biomécanique cornéenne pour le suivi du CXL, développée dans cette thèse, est l'exemple typique d'une forte demande des cliniciens pouvant motiver le transfert de la technologie SSI dans le monde de l'ophtalmologie. Au terme de cette thèse, il apparaîtra clairement au lecteur que seule la mise sur le marché d'un appareil de quantification du profil de durcissement de la cornée pourra répondre à certaines questionnement fondamentaux sur le mode d'action et l'ajustement des protocoles de CXL pour les patients.

Les domaines d'applications d'un tel outil sont certainement plus larges et appartiennent à au moins 4 grandes catégories :

- Le dépistage des anomalies biomécaniques latentes (Kératocône) dans le bilan préopératoire des chirurgies réfractives cornéennes.
- L'évaluation de la pression oculaire corrigée par les disparités biomécaniques (Glaucome à pression normale).
- Le suivi des différentes cornéoplasties comme, par exemple, le CXL.
- La mesure de la contraction du muscle ciliaire pour l'évaluation dynamique de la presbytie.

L'étape suivante sera donc la réalisation d'une interface intelligente pouvant faire varier la tension de la cornée et évaluer le profil de déformation afin de définir un comportement normal et anormal sur une population saine, puis porteuse de KC ou de Glaucome par exemple.

Cette dernière avait été ébauchée dans les premières étapes de ce travail collaboratif, car initialement, le projet MICROELASTO devait inclure directement une phase clinique menée sur des patients au CHU de Bordeaux (le CPP correspondant avait été accepté sur la base de la sonde marquée CE, à faible poussée). En pratique, nous avons dû modifier le contenu du projet au décours des premiers test d'imagerie sur des yeux humains démontrant la nécessité de réaliser des poussées ultrasoniques bien plus fortes que nécessaires sur les cornées porcines et malheureusement impliquant le dépassement des seuils FDA de sécurité ultrasonique



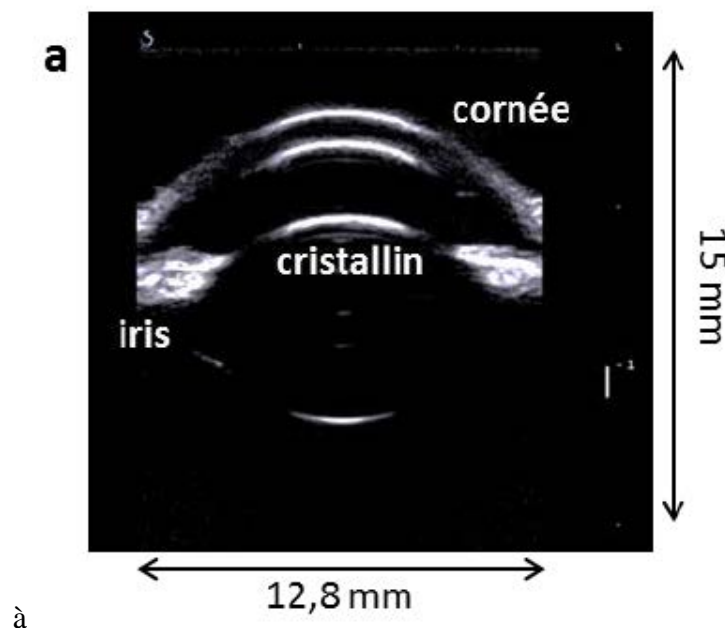
oculaire. Il fallait donc démontrer expérimentalement l'innocuité et démontrer un savoir faire expérimental plus étayé afin de passer les normes CE puis, éventuellement FDA. Par ailleurs, les difficultés ergonomiques pour réaliser l'immersion des yeux rendraient le passage à la phase clinique plus complexe qu'il n'y paraissait au début.

Ce dernier chapitre est l'occasion de tracer le chemin des prochaines étapes du projet Microélasto comportant plusieurs entités :

- Validation de l'innocuité de la sonde élastographique
- Réalisation d'une interface œil/machine compatible
- Mise en place d'une méthodologie pour interprétation des résultats sur l'œil humain

## II – Innocuité de la sonde élastographique

Les normes FDA d'insonification des tissus oculaires sont bien plus drastiques sur l'œil que sur les autres tissus. Elles sont en fait historiquement établies en référence à des normes établies pour l'examen de la rétine. Ce n'est en fait pas tout à fait adapté dans notre cas de figure car les ondes projetées ne peuvent pas focaliser une poussée au delà du cristallin. Cependant, il est difficile de contourner cette limitation sans construire un dossier pour apporter la preuve de conformité de la sonde pour l'application en Ophtalmologie.



**Figure 127:** Champ d'examen de la sonde d'élastographie en B-Mode. Il existe un fort écho

central situé sous la cornée. Il s'agit d'un artefact dû à une réflexion des ultrasons à l'intérieur de la cornée. Cet artefact est limité aux endroits où le faisceau ultrasonore a une incidence normale à la surface de la cornée. Le cristallin est très peu échogène mais les corps ciliaires et l'iris sont très bien vus.

Comme les ultrasons sont réputés pour avoir des effets biologiques mécaniques (pression de radiation ultrasonore, cavitation) et thermiques. En mode diagnostic, il faut contrôler ces effets afin qu'ils n'endommagent pas les structures insonifiées.

La référence la plus répandue est la réglementation de la FDA (US Food and Drug Administration) qui définit les limites de puissances acoustiques à émettre. On remarquera ici que conditions d'insonification sont beaucoup plus restrictives pour l'Ophtalmologie que pour tous les autres organes (facteur 10 environ).

application	$I_{SPTA}$ (mW/cm <sup>2</sup> )	$I_{SPPA}$ (W/cm <sup>2</sup> ) ou MI
<b>vaisseaux périphériques</b>	720	190 1,9
<b>imagerie cardiaque</b>	430	190 1,9
<b>imagerie fœtale ou autres*</b>	94	190 1,9
<b>ophtalmologie</b>	17	28 0,23

\* abdominale, intraopérative, pédiatrique, petits organes (sein, thyroïde, testicules, etc), céphalique néonatale, céphalique adulte

$I_{SPTA}$  = derated Spatial-Peak Temporal Average Intensity

$I_{SPPA}$  = derated Spatial-Peak Pulse-Average Intensity

MI = Mechanical Index

**Figure 128 :** Recommandations FDA pour les intensités acoustiques maximales.

Les différents index sont définis comme suit :

- **Index mécanique (MI) :**  $MI = PNP / \sqrt{f_c}$  où PNP est le pic de pression négative (MPa) atténuée de 0,3 dB/cm/MHz au point focal, qui correspond à l'atténuation dans un tissu mou et  $f_c$  est la fréquence centrale (MHz). Dans le cas de l'imagerie Ophtalmologique, le faisceau ultrasonore est beaucoup moins atténué car il ne traverse que de l'eau (atténuation 2.10<sup>-4</sup> dB/cm/MHz) avant de rencontrer la cornée.

- **ISPTA** : intensité acoustique ou irradiance (W/cm<sup>2</sup>) au point focal moyennée sur la durée d'émission.

- **ISPPA** : intensité acoustique ou irradiance (mW/cm<sup>2</sup>) au point focal moyennée sur la durée d'émission rapportée à la durée totale de l'acquisition.

- **Index thermique (TI)** : rapport entre la puissance acoustique totale et la puissance acoustique nécessaire à élever la température du tissu de 1°C. Pour les tissus mous,

$TI = Wf_c/210$  avec W la puissance émise sur une surface de 1 cm<sup>2</sup> (mW) et  $f_c$  la fréquence centrale (MHz).

Dans le cas de l'homme, il s'est avéré que la cornée était plus dure que ce que nous attendions. De ce fait, avec la sonde que nous avons développée (Cf. Figure 144), il a fallu adapter les séquences d'imagerie afin de pouvoir créer une zone de poussée suffisamment forte dans la cornée pour générer des ondes de cisaillement. Le problème qui s'en suit, est que pour ce type de séquence d'imagerie (constituant en une poussée à fréquence centrale de 11,25 MHz pour 900 demi-cycle ultrasonore à un voltage de 15V), les index MI et ISPTA sont les suivant : MI = 0,47 et IPSTA = 2,235.

L'index MI est donc plus élevé que les normes définies par la FDA, ce qui empêchera toute étude aux Etats-Unis. Cependant pour réaliser une étude clinique en Europe, apporter la preuve que l'utilisation de la technique est inoffensive peut être suffisant pour réaliser un protocole clinique avec CPP. C'est pourquoi nous avons réalisé un protocole animal d'étude d'innocuité sur lapin.

	fréquence centrale (MHz)	bande passante à -6dB (MHz)	nombre d'éléments	pas inter- éléments (mm)	hauteur des éléments (mm)	focale en élévation (mm)
<b>15MHz boîtier coudé</b>	14,4	10,6 – 18,2	128	0,100	1,5	8

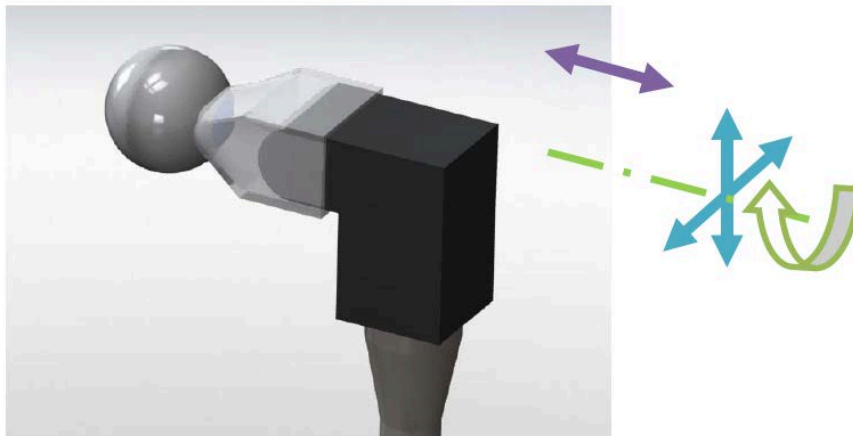
**Figure 129** : Spécifications de la sonde d'élastographie (barrette de 12,8 mm).

Les essais sur 10 paires d'yeux de 10 lapins réalisés durant cette thèse n'ont pas montré de différence significative au niveau histologique dans les conditions expérimentales et les résultats sont détaillés au **Chapitre 3**. La publication prochaine de ces résultats permettra

d'étayer le dossier d'innocuité de la sonde qui sera potentiellement utilisée pour les applications cliniques.

### III- Réalisation d'une interface œil/machine compatible

La simple apposition de la barette échographique avec un milieu de couplage échographique (liquide ou gel) ne suffit pas à assurer un centrage et une stabilité suffisante pour les mesures expérimentales et encore moins l'application en clinique. Il fallut donc très tôt dans le projet, développer une interface pour manipuler la sonde dans les 3 dimensions de l'espace associant aussi la possibilité d'une rotation sur son axe d'observation. Cf. Figure ci-dessous. Nous avons d'emblée imaginé un système adaptable sur la lampe à fente de l'ophtalmologiste, compatible avec la pratique clinique.



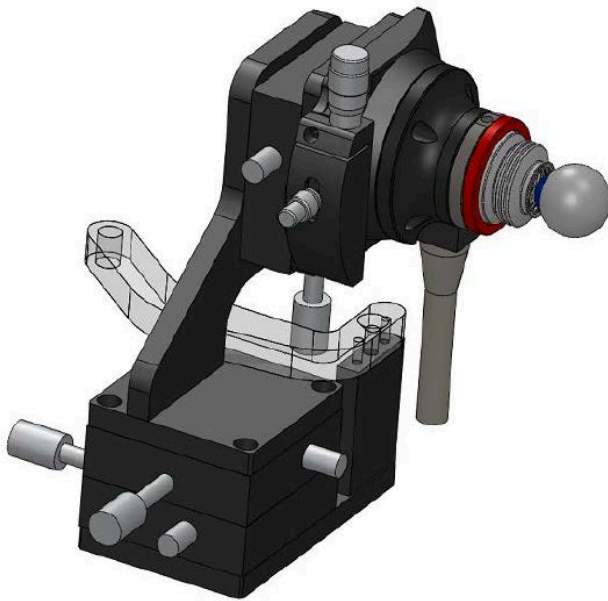
**Figure 130:** Schématisation de la géométrie de la sonde échographique 15 MHz avec les degrés de liberté voulus.

Pour ce faire, nous avons fait appel à un cabinet d'étude (Centre technologique Alphanov, Talence) en lui fournissant un cahier des charges complet comportant :

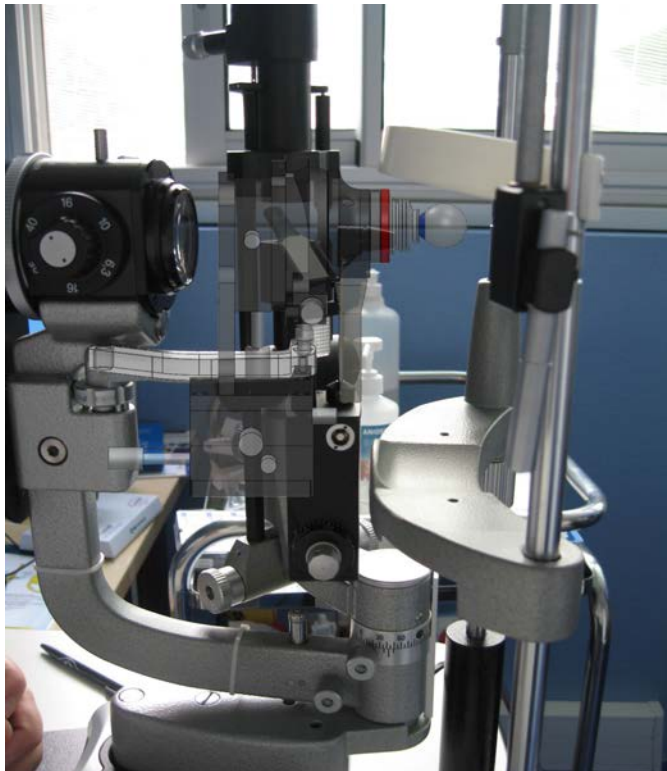
- les caractéristiques géométriques de la sonde,
- les focales et frontales de la sonde,
- les degrés de liberté voulus,
- l'encombrement possible devant le patient en position de tonométrie,
- la pièce métallique habituellement solidaire du tonomètre de Goldman sur une lampe de référence Haag-Streit BQ-900,
- la nécessité de positionner une ventouse en silicone ouverte et apposée sur le limbe cornéen, dessinée comme un soufflet de manière à permettre une

approche douce sans écarteur (le praticien maintenant la paupière supérieure ouverte avec son doigt).

Une modélisation en 3D de l'outil fut réalisée dans un premier temps (Cf. illustrations plus bas) puis le prototype fut réalisé. Il comportait: le porte sonde, un anneau en silicone (moule établi sur mesure) et la connexion avec le bras de la lampe à fente.



**Figure 131** : modélisation de la pièce permettant l'orientation de la sonde, platines micrométriques.



**Figure 132 :** Simulation de la mise en situation ergonomique du prototype d'interface. Celle-ci bascule devant l'œil du patient comme le ferait le tonomètre de Goldman.

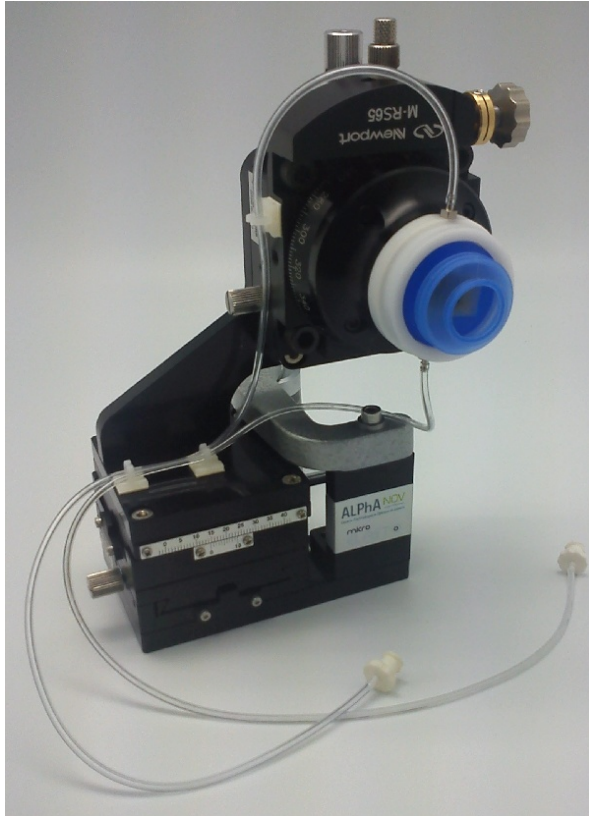


**Figure 133 :** aspect du soufflet /ventouse en silicone.



**Figure 134 :** Aspect du porte sonde en vue de face.

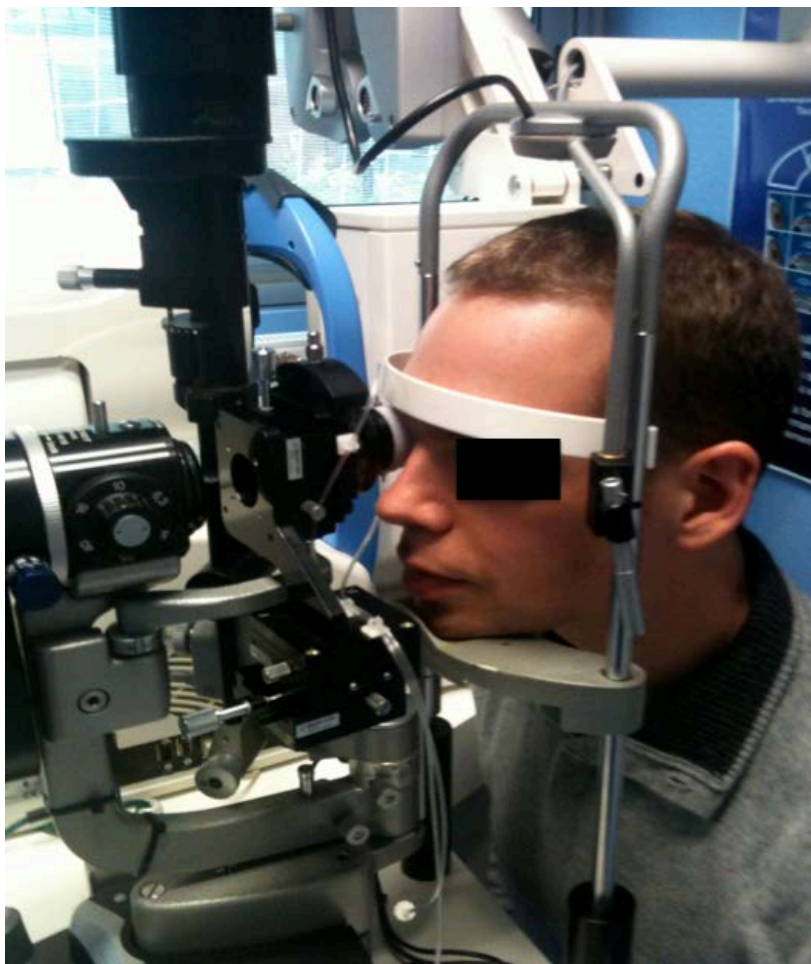




**Figure 135 :** Prototype de l'interface finalisé avec le soufflet et un système d'irrigation implémenté.



**Figure 136 :** Premiers essais de l'interface.



**Figure 137 :** Mise en situation du prototype d'interface sur la lampe à fente.



A ce jour, le prototype n'a pas pu être efficacement testé sur l'œil humain mais a pu être utilisé pour les tests sur le lapin développés dans cette thèse. Les principales interrogations concernent :

- La tolérance de l'interface pour le patient (test réalisé sous anesthésie locale par collyres), le maintien de l'ouverture de l'œil (avec ou sans écarteur complémentaire),
- Le maintien, sans bulle de gaz, de l'étanchéité de la sonde lorsque le patient est assis (viscosité du gel à employer, cinétique d'injection),
- Le nettoyage de la sonde (ventouse à usage unique),
- La durée de la procédure d'acquisition, compatible ou non avec micromouvement de l'œil (mire de fixation pour l'œil controlatéral ouvert).

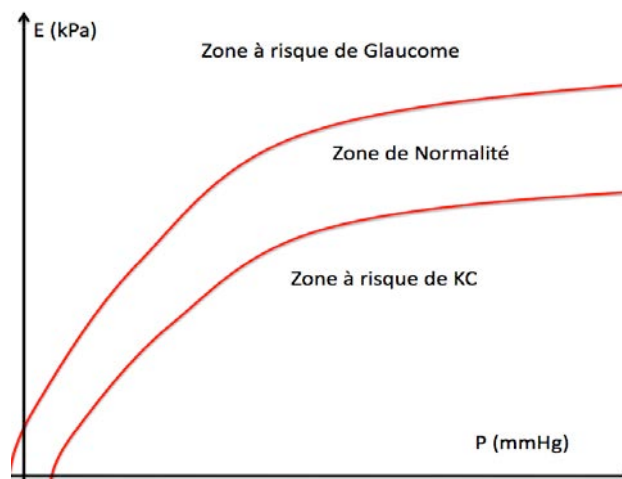
Afin d'éviter la fuite du gel et de limiter les problèmes de stérilisation de la sonde, une amélioration possible de la partie en contact avec l'œil consisterait à obturer la fenêtre d'observation (à l'ouverture de la ventouse) avec un film transparent aux ultrasons, assez souple et fin pour épouser la surface oculaire sans plissement. La faisabilité n'est pas encore testée mais nous avons réalisés chez le lapin un test avec une lentille de contact épaisse montrant le durcissement artéfactuel de la cornée induit par la présence de cette interface supplémentaire. La finesse de la membrane est certainement cruciale dans cette configuration.

#### **IV - Méthodologie de l'examen sur œil humain**

Le problème réglementaire de la sonde est un obstacle majeur pour toute diffusion d'un éventuel produit sur le territoire Américain, le coût d'un nouveau cheminement FDA est en effet considérable. Un éventuel porteur industriel pour le transfert de la technologie serait retissant à la prise de risques compte tenu de cette restriction stratégique. L'objectif réaliste est donc de viser à compenser cette restriction géographique par des attraits commerciaux tels que la convivialité d'utilisation, la multiplicité des applications, et le coût raisonnable. Le point de départ d'une telle aventure pré-industrielle est sans doute de faire la preuve du concept dans le cadre d'un essai à promotion hospitalière, permettant de vérifier la pertinence clinique de la machine.

Comme nous l'avons vu avec les essais sur les porcs et les lapins, il est impossible de dissocier la valeur d'élasticité d'un tissu de la pression intra-oculaire sans implanter une sonde manométrique dans l'œil en question. Cette possibilité est bien sur à proscrire en situation clinique. Il faut donc regarder le profil de déformabilité et non pas les valeurs absolues de dureté pour une cornée donnée. Ceci implique la mise en place d'un système calibré capable d'exercer une élévation de pression intra oculaire continue compatible avec une mesure simultanée de l'élasticité moyenne de la cornée. En toute logique, une progression rapide de l'élasticité en fonction de la variation de pression exercée (par succion ou indentation par exemple) signifierait une faible compliance de l'œil à la déformation et donc une prédisposition à la maladie glaucomateuse. A l'opposé, une réaction trop lente de l'élévation de la dureté en fonction de la variation de pression exercée signifierait une cornée trop facilement déformable, témoignant d'une potentielle défaillance biomécanique assimilable à un KC latent, contre indiquant éventuellement la pratique du LASIK. La zone de normalité ou de sécurité de ce profil biomécanique restera à définir entre les deux options et sera à tester sur des patients reconnus comme sains par d'autres moyens. Ce raisonnement est un point de départ, sujet à une remise en question en fonction des résultats observés. **Cf.**

**Figure 138.**



**Figure 138 :** Concept de dépistage du statut biomécanique des cornées en pratique clinique. En abscisse, la contrainte exercée, en ordonnée, l'élasticité mesurée. Illustration D Touboul.

Une autre alternative pour le dépistage du KC serait de regarder la cartographie d'élasticité et de rechercher un déficit focal atypique par rapport au schéma d'une cartographie normale. Ceci implique une amélioration de la résolution spatiale de l'image (ou un couplage avec une imagerie de type OCT) et un système de rotation des acquisitions très rapide.

## **V – CONCLUSION DU CHAPITRE 4**

Ce dernier chapitre insiste sur l'importance des efforts de développement restant à fournir pour passer de l'outil de mesure expérimental à l'outil diagnostique en clinique.

Les points forts sont, d'une part, l'attente forte de la communauté des Ophtalmologistes pour un produit fiable mesurant la dimension biomécanique des tissus oculaires, et d'autre part, la robustesse des données fournies par la technologie SSI.

Les points faibles sont, d'une part, les contraintes réglementaires imposées par le FDA et d'autre part, les limitations pratiques engendrées par le couplage échographique entre la sonde et la surface oculaire. Le premier aspect semble contournable mais nécessite néanmoins un long cheminement réglementaire. Le deuxième aspect nécessite un renfort d'innovations techniques pour, idéalement, permettre des mesures en position assise. Un repli sur une solution en position allongée est toutefois possible, bien que moins conviviale pour la cible d'activités de dépistage.

Une étude sur l'homme est nécessaire afin de valider la pertinence clinique d'un prototype d'élastographe SSI oculaire. L'ultime étape serait ensuite de trouver l'appui d'un porteur industriel capable d'accompagner ce projet vers la réalisation d'un dispositif médial à part entière.

L'évolution du concept d'élastographie dynamique par ondes ultrasonores vers un concept d'élastographie par ondes électromagnétiques mérite certainement d'être développé à partir du cahier des charges et des bases posées à l'occasion des premiers pas de l'élastographie cornéenne par SSI.

## CONCLUSION DE LA THESE

---

Le CXL est actuellement couramment proposé pour freiner l'évolution du Kératocône, il induit une réaction multifactorielle complexe dont les paramètres biomécaniques sont sensés représenter les indicateurs principaux pour juger de son efficacité.

Notre étude expérimentale souligne la présence de modifications biomécaniques immédiatement observées par SSI après une procédure de CXL trans-épithélial réalisée *in vivo* et assistée par iontophorèse (I-CXL). Moins invasive que la technique de référence, l'I-CXL permet un contrôle expérimental précis de certains paramètres habituellement confondants dans les études tels que: la mise en tension de la cornée, la standardisation des conditions aux limites du tissu, le taux d'hydratation et l'intégrité épithéliale. Nos premiers résultats sur cornée de lapins démontrent un durcissement cornéen non-linéaire, révélé et amplifié par la mise en contrainte croissante du tissu. L'augmentation de l'anisotropie dans le cadre d'un CXL sectoriel fut un indice supplémentaire d'efficacité biomécanique intéressant car évitant le biais d'observation inter-échantillons.

Les résultats histologiques obtenus à une semaine post I-CXL d'une autre série de lapins ont pu montrer une discordance entre l'effet biomécanique et l'apparente faible perte des kératocytes, habituellement retrouvée très intense avec le CXL conventionnel. Cette constatation impose, d'une part, une certaine prudence quant à l'interprétation de l'efficacité du I-CXL et, d'autre part, permet de s'interroger sur les réels mécanismes thérapeutiques du CXL.

Nous pensons que l'analyse élastographique de l'I-CXL par SSI est une alternative particulièrement innovante pour la compréhension de la participation de l'effet de photo-polymérisation dans le processus global impliqué dans la procédure du CXL.

Le résultat des tests d'innocuité permettra le montage d'une étude exploratoire visant à évaluer les performances de la technologie SSI en application au suivi des CXL réalisés en pratique clinique.

---

---

## LES POINTS FORTS DE CE TRAVAIL DE THESE

---

- **Travail collaboratif innovant fondé sur un savoir faire multi disciplinaire unique dans le monde.**
- **Confirme l'effet biomécanique immédiat du CXL, réalisé *in vivo*, dans des conditions quasi-physiologiques.**
- **Permet d'envisager un modèle expérimental réaliste pour optimiser les protocoles de CXL.**
- **Ouvre le débat sur les mécanismes cliniques intimes du CXL.**
- **Permet d'établir le cahier des charges pour la conception d'un élastographe capable de passer à l'étape du transfert technologique, adressant à un vaste champ d'applications cliniques : cornéoplasties, chirurgies réfractives, glaucome et presbytie.**

## ANNEXES

---

### Liste des publications de l'auteur reliées à la thèse

#### Recherche fondamentale sur CXL

1. **Touboul D**, Gennisson J, Nguyen TM, Robinet A, Roberts CJ, Tanter M, Grenier N. Supersonic shear wave elastography for the in vivo evaluation of trans-epithelial corneal collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Mar 28;55(3):1976-84.
2. Nguyen TM, Aubry JF, **Touboul D**, Fink M, Gennisson JL, Bercoff J, Tanter M. Monitoring of Cornea Elastic Properties Changes during UV-A/Riboflavin-Induced Corneal Collagen Cross-Linking using Supersonic Shear Wave Imaging: A Pilot Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, (2012). 53(9), 5948–54.
3. Tanter M, **Touboul D**, Gennisson JL, Bercoff J, Fink M. High-resolution quantitative imaging of cornea elasticity using supersonic shear imaging. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, (2009). 28(12), 1881–1893.

#### Recherche clinique sur le CXL

4. **Touboul D**, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal Confocal Microscopy Following Conventional, Transepithelial, and Accelerated Corneal Collagen Cross-linking Procedures for Keratoconus. *Journal of refractive surgery*, (2012). 28(11), 769–76.
5. Asri D, **Touboul D**, Fournié P, Malet F, Garra C, Gallois A, Malecaze F et al. Corneal collagen crosslinking in progressive keratoconus: multicenter results from the French National Reference Center for Keratoconus. *Journal of cataract and refractive surgery*, (2011). 37(12), 2137–43.

## Recherche clinique sur la biomécanique du Kératocône (ORA)

1. Lazreg S, Mesplié N, Praud D, Delcourt C, Kamoun H, Chahbi M, Leoni-Mesplié S, **Touboul D** et al. Comparison of corneal thickness and biomechanical properties between North African and French patients. *Journal of cataract and refractive surgery*, (2013). 39(3), 425–30.
2. **Touboul D**, Bénard A, Mahmoud AM, Gallois A, Colin J, Roberts CJ. Early biomechanical keratoconus pattern measured with an ocular response analyzer: curve analysis. *Journal of cataract and refractive surgery*, (2011). 37(12), 2144–50.
3. **Touboul D**, Roberts CJ, Kérautret J, Garra C, Maurice-Tison S, Saubusse E, Colin J. Correlations between corneal hysteresis, intraocular pressure, and corneal central pachymetry. *Journal of cataract and refractive surgery*, (2008). 34(4), 616–622.
4. Kérautret J, Colin J, **Touboul D**, Roberts CJ. Biomechanical characteristics of the ectatic cornea. *Journal of cataract and refractive surgery*, (2008). 34(3), 510–3.

## Liste des présentations orales de l'auteur reliées à la thèse

1. **D Touboul**, JL Gennisson, TM Nguyen, A Robinet, M Tanter, N Grenier. Elastographie par analyse de propagation des ondes de cisaillement pour l'évaluation du *cross-linking* cornéen trans-épithélial assisté par iontophorèse. SFO 2014, Paris
2. TM. Nguyen, JF. Aubry, **D. Touboul**, J. Bercoff, M. Tanter, "In vivo monitoring of the corneal collagen cross-linking using Supersonic Shear wave Imaging: feasibility study on porcine corneas", Acoustics 2012, Avril 2012, Nantes (France)
3. TM. Nguyen, JF. Aubry, **D. Touboul**, J. Bercoff, M. Tanter, "Assessment of shear anisotropy using Supersonic Shear Imaging with rotating arrays: in vivo evidence of cornea elastic anisotropy", IEEE International Ultrasonics Symposium, Octobre 2011, Orlando (Etats-Unis).
4. TM. Nguyen, JF. Aubry, **D. Touboul**, J. Bercoff, M. Tanter, "In vivo assessment of the cornea shear anisotropy using Supersonic Shear Imaging", International Tissue Elasticity Conference, Octobre 2011. Lauréate du "Best Student Paper Award". Arlington (Etats-Unis).
5. TM. Nguyen, M. Couade, JL. Gennisson, **D. Touboul**, P. Humbert, J. Bercoff, M. Fink, M. Tanter, "On the propagation of guided elastic waves in thin plates for quantitative shear wave elastography of the cornea and the skin", International Tissue Elasticity Conference, Octobre 2010. Salt Lake City (Etats-Unis).
6. TM. Nguyen, JL. Gennisson, **D. Touboul**, P. Humbert, J. Bercoff, M. Fink, M. Tanter, "Shear wave propagation in complex sub-wavelength tissue geometries: theoretical and experimental implications in the framework of cornea and skin Shear Wave Imaging", IEEE International Ultrasonics Symposium, Octobre 2010. San Diego (Etats-Unis).
7. M. Tanter, JL. Gennisson, **D. Touboul**, TM. Nguyen, J. Bercoff, M. Fink, « High-resolution quantitative imaging of cornea elasticity using the Supersonic Shear Imaging technique », IEEE International Ultrasonics Symposium, Septembre 2009. Rome (Italie).
8. M. Tanter, JL. Gennisson, **D. Touboul**, TM. Nguyen, J. Bercoff, M. Fink, "Quantitative cornea elasticity mapping using high frequency Supersonic Shear Imaging", International Conference on the Ultrasonic Measurement and Imaging of Tissue Elasticity, Septembre 2009. Vlissingen (Pays-Bas).
9. **D Touboul** et al. New transient elastographic technologies. Eurokeratoconus II, Main symposium : 23-24-25 Septembre 2011, Bordeaux.
10. **D Touboul** et al. Evaluation expérimentale de la biomécanique cornéenne par élastographie transitoire. Rencontres SFO-EVER 2011. 7 mai 2011, Paris.
11. **Touboul** et al. La biomécanique cornéenne revisitée. Invitation au DIU de microchirurgie oculaire, Hôtel Dieu Paris, 8 janvier 2011.
12. **D Touboul** et al. Ocular supersonic Shear Wave imaging. ESCRS 2010, Paris.
13. **D Touboul** et al. Can we correlate corneal elasticity and intraocular pressure with OSSSI transient elastography? ESCRS 2010, Paris.



14. **D Touboul**, TM Nguyen, M Tanter, JL Gennisson, J Berkoff, M Fink, J Colin. Evaluation du corneal cross linking par analyse Elastographique des ondes de cisaillement intra-cornéennes : preuves expérimentales. SFO 2010, 11 mai 2010, Paris.
15. **D Touboul** et al. Ocular supersonic Shear Wave imaging: effect of collagen corneal cross-linking. Wavefront Congress, conférence sur invitation, 27 Février 2010, San Francisco.
16. **D Touboul**, M Tanter, JL Gennisson, TM Nguyen, J Bercoff, M Fink, J Colin. Supersonic Shear Wave Imaging for corneal biomechanical assessment: experimental results. ESCRS 2009, Mardi 15 Septembre, Barcelone.
17. **D Touboul**, M Tanter, JL Gennisson, J Berkoff, M Fink, J Colin. Les premiers pas de l'Elastométrie cornéenne par imagerie supersonique des forces de cisaillements. SFO 2009, Paris.

## REPRODUCTION DES PUBLICATIONS CENTRALES POUR LA THESE

### Cornea

# Supersonic Shear Wave Elastography for the In Vivo Evaluation of Transepithelial Corneal Collagen Cross-Linking

David Touboul,<sup>1</sup> Jean-Luc Gennisson,<sup>2</sup> Thu-Mai Nguyen,<sup>2</sup> Antoine Robinet,<sup>1</sup> Cynthia J. Roberts,<sup>3</sup> Mickael Tanter,<sup>2</sup> and Nicolas Grenier<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Ophthalmology Department, National Reference Center for Keratoconus (CRNK), Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux, France

<sup>2</sup>Institut Langevin-Ondes et Images, École Supérieure de Physique et de Chimie ParisTech, Paris, France

<sup>3</sup>Department of Ophthalmology and Department of Biomedical Engineering, The Ohio State University, Columbus, Ohio

<sup>4</sup>Radiology Department, Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux, France

<sup>5</sup>Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) 1026 unit, Bordeaux University, France

Correspondence: David Touboul, Ophthalmologic Department, Bordeaux University, France; david.touboul@chu-bordeaux.fr.

Submitted: October 15, 2013  
Accepted: January 21, 2014

Citation: Touboul D, Gennisson J-L, Nguyen T-M, et al. Supersonic shear wave elastography for the in vivo evaluation of transepithelial corneal collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:1976-1984. DOI:10.1167/iov.13-13445

**PURPOSE.** To assess corneal stiffening with supersonic shear wave imaging (SSI) technology in an experimental model of iontophoresis-assisted transepithelial corneal collagen cross-linking (I-CXL).

**METHODS.** Six rabbits underwent full, central I-CXL in one eye. The contralateral eye served as control. In vivo iontophoresis was used for 10 minutes to perform transepithelial delivery of riboflavin prior to UV-A irradiation. Accelerated UV-A protocol was applied for 9 minutes with a 10-mW/cm<sup>2</sup> irradiance. Animals were killed and both treated and control corneas were then immediately mounted on a corneal artificial anterior chamber and internal pressure was varied from 15 to 50 mm Hg in 5-mm Hg increments. Swelling was evaluated via central corneal thickness measurements. Ex vivo inflation tests were monitored using SSI technology that provides real-time mapping of the corneal elasticity.

**RESULTS.** Corneal yellowing of the central 9-mm diameter area was clearly visible in the iontophoresis area of all treated eyes. Elasticity versus internal pressure revealed significant differences of the change in elasticity coefficient with pressure between I-CXL-treated and control corneas with a mean slope that was 27.1 and 16.9 kPa/mm Hg, respectively ( $P = 0.029$ ). Differences in elasticity at individual pressure levels between groups were statistically significant above 40 mm Hg ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSIONS.** Intraocular pressure variations were the most important limitations for in vivo stiffness monitoring with SSI because stiffness is a function of internal pressure. Supersonic shear wave imaging succeeded in comparing corneas that underwent I-CXL by performing ex vivo inflation tests where pressure was controlled. Iontophoresis-assisted transepithelial corneal collagen cross-linking corneas exhibited increased resistance to pressure rise, indicating stiffening. In vivo I-CXL and ex vivo SSI is an interesting model to evaluate the sole effect of photopolymerization occurring in the CXL process close to physiological conditions.

**Keywords:** cornea, keratoconus, shear wave elastography, supersonic shear wave imaging, elasticity, biomechanics, corneal collagen cross-linking, riboflavin, iontophoresis

Within the last 10 years, conventional corneal collagen cross-linking (C-CXL) with riboflavin application and UV-A (375 nm) irradiation has become the gold-standard procedure to limit the progression of ectasia in keratoconus patients.<sup>1,2</sup> From the clinician point of view, C-CXL remains invasive as the corneal epithelium must be removed to allow the photosensitizer to soak the anterior part of the cornea. Moreover, further cases of severe complications have been published corresponding to excessive UV-A effects or to unpredictable healing troubles.<sup>3</sup> Thus, the motivation to avoid epithelium removal during C-CXL is very strong.

Iontophoresis is defined as a noninvasive technique where a constant electric current is applied to enhance penetration of an ionized substance into a tissue without epithelial removal.<sup>4</sup>

It has been used in various fields of medicine,<sup>5-7</sup> for example, local transdermal administration of anesthetics, antiinflammatories, or analgesics, as well as transmucosal administration of antivirals.<sup>8</sup> In ophthalmology, the first studies of iontophoresis were performed in the 1940's with the administration of antibiotics for the treatment of bacterial endophthalmitis and keratitis.<sup>9</sup> By the end of the century, iontophoresis was extensively investigated for delivering ophthalmic drugs, including dyes, antibacterial, antiviral, antifungal, steroids, antimetabolites, and oligonucleotides.<sup>10-12</sup> Ocular iontophoresis is still under investigation as an answer to the low bioavailability of drugs after topical administration and to the potential serious complications after intraocular injections used for the treatment of several eye disorders. Recently, the idea of a

Copyright 2014 The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Inc.  
www.iovs.org | ISSN: 1552-5783

1976



transepithelial (TE) CXL procedure assisted by iontophoresis (I-CXL) has been considered as a promising method to overcome the lack of corneal epithelial permeability to riboflavin and obtain an adequate intrastromal riboflavin concentration prior to the UV-A irradiation.

To support the preliminary clinical results and to reach a better understanding of the CXL interaction within the stromal layer, an experimental model of I-CXL is needed. For this purpose our team has proposed, since 2009, the use of an innovative ultrasound system called supersonic shear wave imaging (SSI) for corneal biomechanics imaging.<sup>13</sup> A previous study has already demonstrated the feasibility of *in vivo* corneal stiffness monitoring in a porcine model.<sup>14</sup> The purpose of the present study was to analyze corneal biomechanical changes induced by the I-CXL protocol using SSI technology with an *in vivo* rabbit model.

## METHODS

### Animal Preparation

Six rabbits (New Zealand White albino, males; Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were involved in this study to allow six *in vivo* I-CXL procedures with six contralateral controls and subsequent *ex vivo* SSI inflation testing in all 12 eyes. Each rabbit underwent unilateral I-CXL on the right eye; the left eye was used as intra-individual control. All rabbits were treated under general anesthesia performed with ketamine hydrochloride (Virbac, Carros, France) and acepromazine (Calmivet; Vétoquinol, Paris, France). Animals were euthanized after the treatment by intravenous injection of Propofol and both eyes were enucleated for SSI testing. Procedures involving experimental animals were performed in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and approved by the ethics committee of Bordeaux University of Medicine (Bordeaux, France).

### Supersonic Shear Wave Imaging

Details of the SSI technique can be found in previous publications.<sup>13,14</sup> Briefly, SSI is an ultrasound-based technique able to map tissue elasticity in real time. This is achieved by quantifying the speed of shear waves  $V_s$  (directly linked to elasticity  $E$  by the relationship  $E \approx 3\rho V_s^2$ , where  $\rho$  is the density) generated within the tissue. Shear waves are generated by focused ultrasound (focused beams) and detected in real time by using ultrafast ultrasound imaging (up to 20,000 frames/s). The entire sequence is performed by one single linear ultrasound probe (15 MHz central frequency, 128 elements; Vermon, Tours, France) driven by an ultrafast ultrasound scanner (Aixplorer; Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France).<sup>13</sup> In the dedicated sequence for the cornea, six "focused beams" are applied successively at equally-spaced locations across the cornea diameter. The whole acquisition sequence lasts a few milliseconds. Each focused beam is used to rebuild a partial elasticity map. Then the six partial reconstructions are recombined to yield a whole cornea map. Then by using a time of flight algorithm on the acquired shear wave movie, the shear wave speed is computed to rebuild an elasticity map. Elasticity maps are then superimposed over the conventional B-mode ultrasound image with a frame rate of 1 map/s, which allows real-time visualization of elasticity changes.

### Iontophoresis Device and I-CXL Protocol

The iontophoretic device consists of a constant current source and two electrodes. The substance to be delivered is applied

with a main electrode carrying the same charge as the substance, while a return electrode carrying the opposite charge and placed at another location of the body, completes the circuit. The substance conducts the current through tissues. For rabbits, the return electrode is a small gauge needle placed in the nape of the neck. The main electrode is a circular cup with an internal diameter of 9 mm (Iontofor-CXL; Sooft Italia, Montegiorgio, Italy), surrounded by a 1-mm wide annular suction ring to affix the device on the cornea during the procedure. The electrode itself is a stainless steel grid, placed into the cup at an average distance of approximately 8 mm from the cornea, allowing air bubbles generated by electrolysis of water to escape in order to prevent current supply disruption. The reservoir was filled with riboflavin solution formulated for iontophoresis (Ricrolin; Sooft Italia). Its large volume (0.5 mL) prevents pH and concentration shifts to occur during the application time while using a minimal quantity of buffer that competes with the substance for delivery. The generator applies a constant current of 1 mA for a 5-minute preset period, yielding a delivered dose of 5 mA/min, while controlling the continuity during the procedure and delivering warnings in case of current disruption.

Once the anterior part of the stroma reaches an adequate concentration of riboflavin (5–10 minutes), the UV-A irradiation can take place and cross-linking of collagen fibers can immediately occur in this area. In that configuration, accelerated UV-A protocol (A-CXL)<sup>15</sup> is more suitable to experimental models than the conventional UV-A protocol because the shorter exposure time prevents (1) excessive decrease of riboflavin concentration in the anterior part of the cornea during the application time of UV-A, (2) excessive fluctuation of corneal hydration before biomechanical measurements,<sup>16</sup> and (3) reduces the risk related to anesthesia.

In our study, two consecutive cycles of 5 minutes were performed for a total of 10 minutes. To avoid any unnecessary strain on the rabbit's eyeball, we used only adhesive strips to maintain subsequent eyelid opening without forceps. Iontophoresis-CXL was performed first while the opposite eye was temporarily closed with strips. The rabbit's anatomy allowed direct and easy access to the corneal suction area, which was successfully obtained on the first attempt in all cases. The integrity of the corneal epithelium was verified before and after I-CXL with a fluorescein solution under blue light testing using our handheld slit-lamp. During iontophoresis, the cornea was immersed under riboflavin fluid, and after iontophoresis, fluorescein-staining test was performed after rinsing the surface with balanced salt solution (BSS) in order to remove the remaining riboflavin. Fluorescein was also removed with rinsing before UV-A irradiation. After the iontophoresis process, yellowing of the corneal tissue was clearly visible in the riboflavin soaked area. The UV-A beam (8-mm diameter, Vega CBM X-linker; Sooft Italia) was immediately focused on this area for 9 minutes with an irradiance of 10 mW/cm<sup>2</sup> (total dose of 5.4 mJ/cm<sup>2</sup>; Fig. 1).

We did not measure temperature, osmolarity, or pH changes<sup>17</sup> before or after the iontophoresis process because we were informed by the iontophoresis manufacturer that in the range of our experimental protocol, epithelium integrity, and riboflavin fluid stability were previously established and reported in the safety procedure to obtain Conformité Européenne marking (Roy P; unpublished data, 2011).

### Corneal Elasticity Monitoring Protocol and Inflation Tests

After I-CXL, animals were euthanized and corneas from both eyes were removed with a scleral rim of at least 2 mm. Then, each cornea was immediately mounted on an artificial anterior



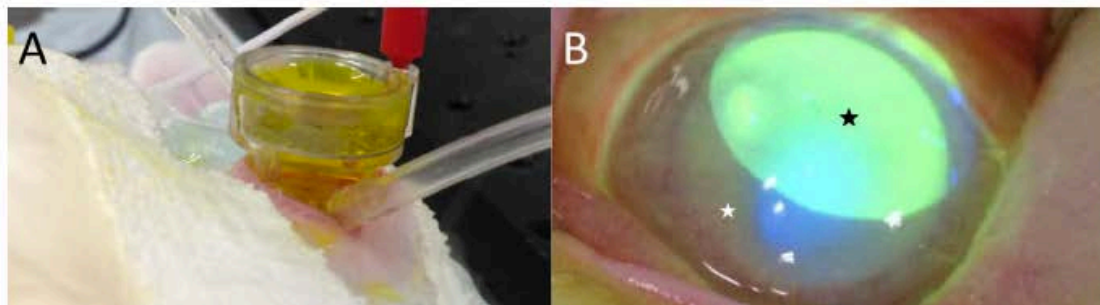


FIGURE 1. (A) Iontophoresis device used with a reservoir filled with riboflavin; (B) illustration of the riboflavin-soaked area (white star) and the riboflavin fluorescence (black star) when the illumination beam is voluntarily displaced.

chamber (AAC; DORC, Zuidland, The Netherlands) (Figs. 2A, 2B). The pressure was continuously monitored with a digital manometer (BiosebAZ 8215; Bioseb, Vitrolles, France) connected to one port of the AAC. A liquid was infused through the second port of the AAC in order to adjust pressure within the chamber. The infusion liquid was a hypertonic solution used for the purpose of deswelling in corneal graft procedures (ThinC; Alchimia, Padova, Italy), the same liquid was used to bathe the anterior surface of the cornea while performing elastography acquisitions. The ultrasound probe was vertically placed above the cornea, perpendicular to the corneal surface. The probe was mounted on micrometer translation and rotation stages allowing very precise three-dimensional (3D) positioning (Fig. 2C). The probe was aligned with the corneal apex using real-time B-mode display. Once alignment was optimized, the shear wave elastography mode was activated, providing real-time visualization of corneal stiffness (kPa) represented by a color scale. Additionally, corneal central thickness (CCT) measurements were performed with ultrasonic pachymeter (CS-100; Tomey, Yokohama, Japan) before and after iontophoresis, after CXL, as well as before and after SSI.

Inflation tests of the cornea were performed as follows:

1. The pressure in AAC was raised from 15 to 50 mm Hg by increments of 5 mm Hg.
2. Elasticity maps were recorded at each pressure level after 10 seconds of stabilization. Two inflation cycles (rising pressure) were performed for each cornea but only the second cycle was used for further analysis (the first one was used to ensure that there was no fluid leakage).

Mean elasticity values were obtained through the analysis of the central 3 mm of the cornea. Corneal stiffening versus pressure were plotted for both I-CXL and controls. The slope of each curve was computed by applying linear regression analysis. A comparison of that slope between I-CXL and controls was performed for each rabbit.

### Statistical Analysis

A one-way variance analysis was applied to evaluate the difference between the treated and the control corneas. A one-way variance analysis gives the *P* value that several samples

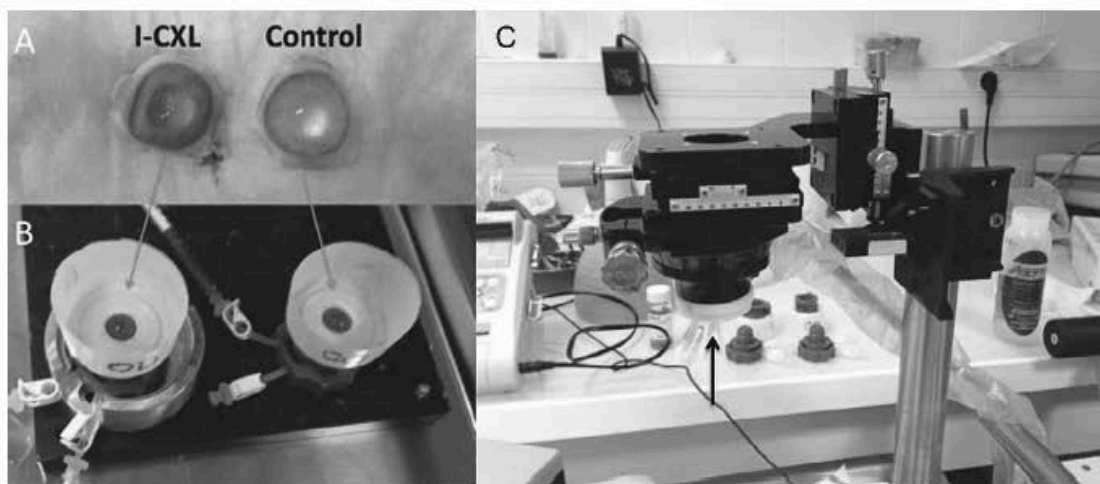
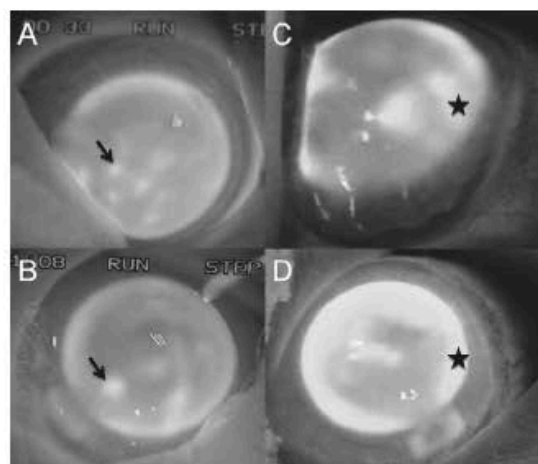


FIGURE 2. (A) One paired excised corneal buttons. (B) Mounting on the artificial anterior chambers. (C) The ultrasound probe (arrow) is mounted on precision translation and rotation stages.



**FIGURE 3.** Illustration showing the heterogeneous pattern of riboflavin fluorescence with paracentral hot spots (arrows in [A, B]) and peripheral reinforcement ring (stars in [C, D]) during UV-A period of several I-CXL procedures. (A, B) pictures were taken with top incidence with the Vega CBM X-linker camera, (C, D) are white illumination pictures taken with a lateral incidence.

are drawn from populations with the same mean. Thus, if a low  $P$  value is obtained, the null hypothesis is rejected (i.e., the samples are significantly different). Differences between treated groups and control groups were considered significant at  $P$  less than 0.05 (Statplus, Microsoft Excel 2008; Microsoft, Redmond, WA).

## RESULTS

### Iontophoresis Procedure

Corneal yellowing of the central 9-mm diameter area was clearly visible in the eyes treated using iontophoresis. When

exposed to UV-A light, a green fluorescence appeared where the riboflavin had successfully impregnated the cornea. The green fluorescence intensity in this area was not homogenous and exhibited a ring of hyperfluorescence at the edges of the iontophoresis area (outer diameter of 9 mm) in all cases. Furthermore, some "fluorescence hot spots" were also observed in the central area without a specific pattern (diameter of approximately 1–3 mm; Fig. 3). Fluorescein staining with blue light testing was systematically negative before and after I-CXL.

### Corneal Central Pachymetry Monitoring

The CCT was neither significantly affected by iontophoresis nor by CXL. The mean CCT was 388  $\mu\text{m}$  (SD 22  $\mu\text{m}$ ) before iontophoresis, 395  $\mu\text{m}$  (SD 21  $\mu\text{m}$ ) after iontophoresis, 376  $\mu\text{m}$  (SD 18  $\mu\text{m}$ ) after UV-A, 400  $\mu\text{m}$  (SD 18  $\mu\text{m}$ ) before SSI, and 392  $\mu\text{m}$  (SD 16  $\mu\text{m}$ ) after SSI. Mean CCT for controls were 392  $\mu\text{m}$  (SD 12  $\mu\text{m}$ ) before euthanasia, 393  $\mu\text{m}$  (SD 6  $\mu\text{m}$ ) before SSI, and 400  $\mu\text{m}$  (SD 11  $\mu\text{m}$ ) after SSI.  $P$  values comparing in vivo (pre-iontophoresis) and ex vivo (post SSI) for right and left eyes were 0.58 and 0.31, respectively (Table 1).

### Corneal Inflation Testing

Figure 4 shows an example of the corneal elasticity imaging during an inflation test. Corneal stiffness increased with increasing pressure in both experimental and control eyes, as expected. A threshold was applied to the elasticity display (color scale) to account for the quality of the elasticity estimation. The area reaching this threshold shrinks as the pressure increases. Indeed, the higher the pressure, the stiffer and less deformable is the cornea, leading to lower amplitudes of the shear wave. This affects the elasticity estimation especially in the peripheral part of the cornea that undergoes a higher stress than the central part. We used a threshold on the elasticity estimation quality to ensure the accuracy and robustness of our measurements.

For all the rabbits examined in our study, increasing pressure revealed differences between corneas that underwent I-CXL and their respective controls. In the relevant range of

**TABLE 1.** Corneal Central Thickness Measured With an Ultrasound Pachymeter at Different Steps of the Experimental Procedure for Right (R) and Left Eyes (L)

Rabbits' CCT, $\mu\text{m}$	CCT Pre IONTO	CCT Post IONTO	CCT Post UV-A	CCT Prior SSI (Ex Vivo)	CCT After SSI (Ex Vivo)	CCT Difference R-L Prior SSI (Ex Vivo)	CCT Difference R-L After SSI (Ex Vivo)
$P$ values (R vs. L)	0.52			0.43	0.91		
1	R 375 L 395	R 390	R 385	R 410 L 385	R 400 L 405	25	5 (–)
2	R 390 L 380	R 420	R 365	R 395 L 390	R 380 L 405	5	25 (–)
3	R 355 L 380	R 375	R 380	R 405 L 395	R 410 L 380	10	30 (–)
4	R 390 L 395	R 410	R 400	R 425 L 390	R 385 L 400	35	15 (–)
5	R 400 L 415	R 370	R 350	R 400 L 405	R 370 L 395	5 (–)	15 (–)
6	R 420 L 390	R 410	R 380	R 370 L 395	R 410 L 415	25 (–)	5 (–)
Mean	R 388	R 395	R 376	R 400	R 392	17	15
(SD)	–22	–21	–18	–18	–16	–12	–10
Mean	L 392			L 393	L 400		
(SD)	–12			–6	–11		

Corneal central thickness values were rounded to 5-increment units during measurements.  $P$  values comparing mean values of right and left eyes are reported. IONTO, iontophoresis.



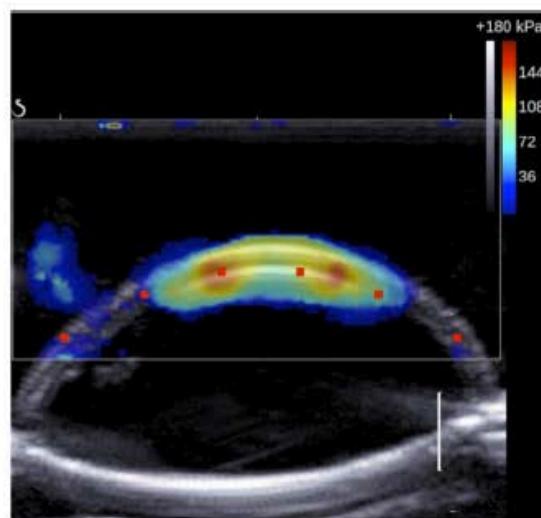


FIGURE 4. Illustration of one ex vivo inflation testing showing corneal elasticity imaging (color scale, kPa) at 35 mm Hg of pressure. The red dots superimposed to the elasticity maps indicate the lateral positions of the "pushing beams." There is a 2-mm spacing between two consecutive red dots.

stress that allows subsequent SSI imaging (inflation test from 15–50 mm Hg), the elasticity variation appeared to be a linear function of pressure:  $E = \alpha p + \beta$ , where  $E$  is Young's modulus (kPa),  $p$  the inflation pressure (mm Hg),  $\alpha$  and  $\beta$  coefficients of linear regression, the slope and intercept, respectively (Table 2). Figure 5 shows the slopes of both treated- and control eyes for each rabbit elasticity-pressure curve ( $n = 6$ ). The mean slope was 27.1 and 16.9 kPa/mm Hg, respectively, in the I-CXL group and control group, reaching a statistically significant increase factor of a 1.6 ( $P = 0.029$ ) with one tailed  $t$ -test.

Mean elasticity values versus inflation testing were summarized in Table 3 for each level of pressure. Mean differences between groups were statistically significant for pressures above 40 mm Hg ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Corneal stiffening due to the CXL is a subtle and challenging interaction to detect in clinical practice and, to date, there is no reliable tool to assess variations of the corneal stiffness in patients after CXL.<sup>18</sup> One of the main reasons is probably the difficulty to distinguish stiffness changes related to CXL with stiffness changes related to in vivo IOP variations. Laplace's Law for a pressurized vessel states that wall tension is a function of the internal pressure, such that the greater the

internal pressure, the greater the wall tension. This means that as IOP increases, the cornea becomes stiffer due to its known nonlinear properties. Another important concern is to get reliable physical parameters corresponding to the tissue stiffness instead of indirect measurements that are viscoelastic in nature (e.g., corneal hysteresis). Thus, in order to demonstrate and to quantify the stiffening induced by any CXL protocol, it remains necessary to get (1) an experimental model with controlled parameters (i.e., hydration state, corneal shape and pachymetry, and load of pressure and motion), (2) an appropriate elastometry technology that is as minimally invasive as possible (i.e., remote observation, minimal stress, geometrical and histological homeostasis, and respect of the boundary conditions). We will discuss successively the choice of our experimental setup, the main results we obtained with I-CXL, the study limitations and further work to be done.

## Experimental Setup and Model Justification

Rabbits eyes have many similarities with human eyes, but also important differences that are biomechanically relevant: very soft eyeball, smaller corneal thickness ( $\sim 400 \mu\text{m}$ ), larger corneal diameter ( $13 \pm 0.30 \text{ mm}$ ), and greater corneal curvature (radius  $7.26 \pm 0.26 \text{ mm}$ ).<sup>19,20</sup> In addition, the rabbit cornea does not have any Bowman's membrane, which is a possible additional barrier to the permeability of riboflavin during CXL protocols.

We first attempted to perform in vivo elasticity monitoring of the I-CXL procedure. The position of the rabbit body, lying on its side, was found to be the best position to limit breathing movements during in vivo CXL and SSI examination. Nevertheless, in the rabbit anatomy, there is no bone frame to protect the eyeball from external trauma. In our experience, when one of the eyes was aligned vertically toward the elastography probe, the opposite eye was directly compressed on the examination table. From our preliminary tests performed in this position, we observed a significant softening of cornea within a few minutes, probably because the IOP was dramatically decreased. Thus, only the first eye examined could be considered reliable for in vivo pre- and post-CXL comparison. Another confounding factor was the anesthesia depth that could induce unpredictable variations of the IOP (blood pressure, eyelid tonicity) and consequently undesirable changes of the corneal stiffness. Finally, after many trials to overcome the in vivo IOP variations, our conclusion was that the CXL had to be performed in vivo, but the elasticity measurements with SSI required very accurate IOP monitoring, which could only be performed in the ex vivo situation. Therefore, we decided to mount the rabbit's corneas on an AAC immediately after euthanasia, and to use a manometer for adequate inflation pressure control. In order to isolate the effect of the photopolymerization process itself from any other biological secondary process, animals were killed immediately at the end of the I-CXL procedure. Biological secondary effects are expected to vary from human to rabbit species.

TABLE 2. Alpha and  $\beta$  Coefficients of the Linear Regression Curves ( $E = \alpha p + \beta$ ) and Corresponding Values From Right Eye Minus Left Eye

Rabbits	$\alpha$ Right	$\alpha$ Left	$\alpha$ variation R-L	$\beta$ Right	$\beta$ Left	$\beta$ variation R-L
1	20.4	11	9.4	0.6	14	-13.4
2	21.4	10.6	10.8	58.8	14.9	43.9
3	40	28.7	12.7	34.5	14	20.5
4	16.9	10.1	6.8	64.2	64.3	-0.1
5	30.1	21.5	9.6	8.2	18.4	-9.8
6	33.7	19.4	14.3	26.7	17.7	9
Mean (SD)	27.1 (8.9)	16.9 (7.5)	10.2 (2.6)	32.2 (25.8)	23.9 (19.8)	8.4 (21.3)



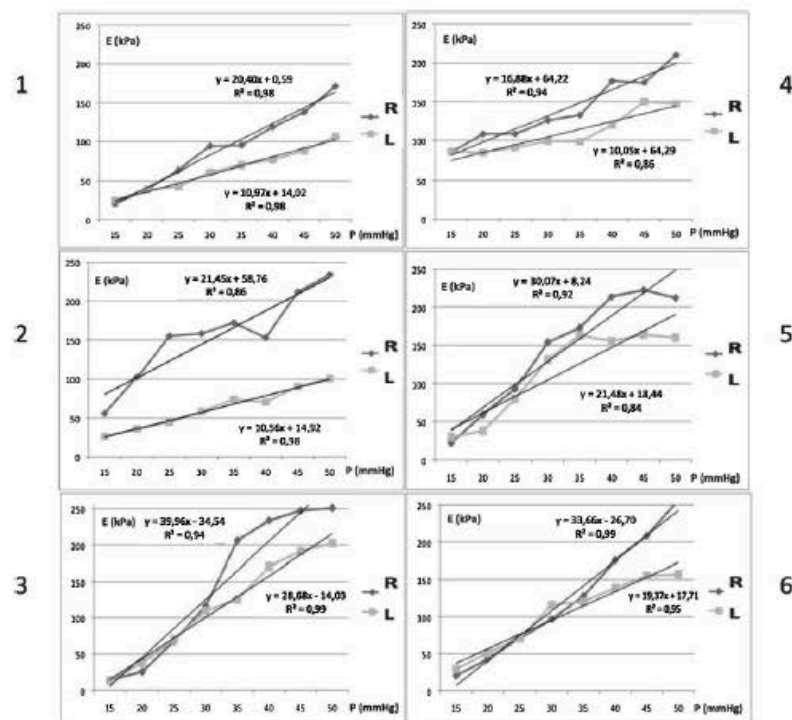


FIGURE 5. Inflation testing with correlations of elasticity and inflation on the right I-CXL cornea compared with the left untreated cornea for the rabbits 1 through 6. The fitting curves and their linear equations serve to quantify differences between groups. See corresponding *P* values for each level of pressure in Table 3.

Finally, since our biomechanical measurements were performed in the *ex vivo* condition, the *in vivo* translation of our conclusions must be done with caution. Possible changes of corneal hydration state could modify the biomechanical behavior. Furthermore, enzymatic degradation processes could occur during the hours after the rabbit's euthanasia with a possible postmortem corneal softening. We attempted to minimize the effects of these postmortem changes on our conclusions by using the experimental design of treated and control eyes from the same animal.

TABLE 3. Young's Modulus Mean Values Versus Different Load of Pressure and Corresponding *P* Values (*n* = 6) in Right (R: I-CXL Group) and Left Eyes (L: Control Group)

Load mm Hg	Mean E (SD) kPa R	Mean E (SD) kPa L	<i>P</i> ANOVA Test
15	36 (28)	34 (25)	0.9326
20	62 (34)	47 (18)	0.3629
25	93 (34)	66 (19)	0.1324
30	124 (30)	95 (33)	0.1200
35	151 (39)	108 (35)	0.0790
40	178 (41)	121 (41)	<b>0.0395</b>
45	200 (38)	139 (41)	<b>0.0262</b>
50	222 (31)	145 (37)	<b>0.0034</b>
Mean	133 (34)	95 (32)	-

Bold values are statistically significant (*P* < 0.05).

### Biomechanical Changes After I-CXL: Pressure-Inflation Testing

As previously mentioned, the corneal stiffness is a function of the biomechanical load, which is represented by the pressure in the AAC. This statement is consistent with knowledge of the ultrastructural properties of corneal tissue. The physical load of pressure will stress the collagen fibers and change their 3D structure, depending of the interconnections of the collagen fibers and the surrounding fundamental substance. It was already demonstrated by Tan et al.<sup>21</sup> that the "wavy structure" of the collagen could be increased after CXL. In the current study, corneas that underwent I-CXL exhibited different biomechanical inflation profiles. The stiffness differences were not clearly visible below the 25 mm Hg load of pressure inflation, but became obvious between 25 and 50 mm Hg and statistically significant above 40 mm Hg. This behavior might suggest a possible change of the biomechanical properties of corneas induced by I-CXL, in a nonlinear fashion.

The relationship between elasticity and pressure was fit with a linear equation. The slope of this linear function was consistently higher in the I-CXL cornea compared with the contralateral untreated cornea in all cases, highlighting stiffening in the corneal biomechanical properties. Even though the comparison of mean Young's modulus values at individual pressure levels below 40 mm Hg did not produce a significant difference between treated- and control corneas, the increased slope of the change in Young's modulus over a wide range of pressures in treated versus control corneas leads

to the conclusion of stiffening. In other words, I-CXL induced greater change in stiffening than in control groups with increasing pressure load. To our knowledge, no anterior data are available in the literature regarding transepithelial inflation testing, even though results of quasistatic optical coherence tomography (OCT) elastography in TE-CXL (BAK) model have shown some similarities with ours.<sup>22</sup>

Finally, we do not have enough data to conclude whether iontophoresis-induced riboflavin pooling might occur in the epithelium. This situation could shield the UV-A light and limit stromal CXL. Nevertheless, electroporation (transcellular pathway) of riboflavin during iontophoresis (intercellular pathway) is probably not a reasonable issue according to a previous study reported in the literature.<sup>23</sup> Furthermore, it has already been reported for C-CXL with transepithelial riboflavin soaking (with riboflavin penetration enhancers) that the epithelium could play a significant role in blocking stromal absorption of UV-A.<sup>24</sup> Nevertheless, I-CXL is a new procedure, and eventually the UV-A dose could be adjusted to account for epithelial absorption after adequate investigation of the effect.

### Study Limitations

In terms of imaging, when the pressure is increased, there is a spatial reduction in the area of elasticity mapping of the cornea. This can be explained by at least two different physical phenomena. (1) As previously mentioned, elasticity values are only displayed if the quality of the estimate reaches a certain threshold: only a correlation coefficient greater than 0.9 are considered when applying the time-of-flight correlation algorithm. This quality is affected by the amplitude of shear wave compared with the noise of shear wave detection (signal-to-noise ratio). As pressure increases, the cornea becomes stiffer and less deformable. Thus, the shear wave exhibits lower amplitude. Therefore, we observe a decrease in the available area of analysis, and (2) as demonstrated by Nguyen et al.,<sup>25</sup> the cornea can be considered as an immersed plate. In such geometrical conditions shear waves are guided into the cornea and their attenuation is mostly due to thickness and curvature. Thus, as pressure increases, the curvature increases and the ultrasound beams become more and more parallel to the surface of cornea, leading to a less effective acoustic pressure generating shear waves. Moreover, the current time-of-flight algorithm (used to calculate the shear wave speed) uses directional filters that track the shear wave perpendicularly to the ultrasound axis. As the shear wave is guided by the cornea geometry, when the curvature increases, shear waves propagate more and more parallel to the ultrasound axis. One should notice that these artifacts could be solved in a future refined version of the algorithm for shear wave estimation.

The corneal thickness can also play a role in the conversion of shear wave speed into elasticity. The cornea acts as a waveguide due to its geometry: both the posterior and the anterior boundary of cornea constrain the shear wave propagation to a particular mode ("guided mode") corresponding to the case of Lamb-like waves. According to the Lamb waves equations, the thinner the cornea is, the more constrained and slowed the shear wave will be.<sup>25</sup> Thus, a thinner cornea would appear softer. Unfortunately, the ultrasound B-mode axial resolution was only 150  $\mu\text{m}$  with the 15-MHz probe we used, limiting our analysis of small variations of the corneal thickness. However, we carefully monitored the CCT throughout the whole procedure using an ultrasound pachymeter (30- $\mu\text{m}$  axial resolution). No significant difference was found between the left and right eyes of the rabbits, thus the comparison of their relative Young's moduli is still valid. Monitoring the corneal thickness was also a key point to ensure that elastic property

changes were not induced by excessive hydration variations.<sup>26</sup> According to Table 1, the comparison of the CCT of right versus left corneas, and I-CXL versus controls, did not show any significant change throughout the different steps of our experimental procedure. The deswelling liquid that we used for bathing the cornea on both sides probably helped in this situation.

Very few papers are available about I-CXL protocols, but the feasibility in humans has already been demonstrated.<sup>27</sup> In our study, the heterogeneous fluorescence of the riboflavin after iontophoresis raised some questions. In theory, if both electric field and tissue permeability were homogenous, riboflavin concentration in the stroma should be constant. In other words, unless we were not measuring riboflavin concentration in the corneal tissue, the riboflavin fluorescence should be homogeneous across the iontophoresis area. That was not the case for our rabbits. In all the cases, we observed small fluorescence "hot spots" (1- to 3-mm wide) randomly visible during UV-A irradiation, inside the iontophoresis area and associated with a ring of higher fluorescence located at the edges of this iontophoresis area (outer diameter of 9 mm). We can assume that stretching forces applied on the epithelium layer during the application of the suction ring could explain this peripheral riboflavin hyperfluorescence. Nevertheless, hot spots are more difficult to explain and could be correlated with some local changes of the corneal epithelium permeability to riboflavin. This phenomenon was not observed in preliminary trials on human corneas,<sup>27</sup> but the rabbit model is distinct from the human because, histologically, there is no visible basal membrane (e.g., Bowman's layer) to ensure a homogenous anchoring of the epithelium into the stroma. Furthermore, experimental rabbits are usually very young (2-3 kg and a few months old), thus their epithelium might be very cohesive with the underneath stromal layer compared with adult human corneas. We did not find any contributive publication on this topic.

We looked at previous experimental studies using corneal iontophoresis with testing on rabbits or rats, including histology that did not report epithelial injuries.<sup>28-30</sup> Furthermore, we do not believe that observed hot spots are correlated with artifact or epithelial injury. Rabbits were managed with considerable caution, avoiding the use of a speculum, corneal exposure, and desiccation. The iontophoresis device when carefully applied, does not injure the epithelium except possibly at the level of the suction ring near the corneal periphery. Corneal pachymetry measurements with the ultrasound probe were always performed in the center, with as little contact as possible. Direct observation with handheld slit-lamp did not exhibit any visible corneal fluorescein staining.

Nevertheless, it is interesting to note that, since fluorescein and riboflavin can both absorb light in the blue region of the spectrum (435-465 nm)<sup>31,32</sup> and will emit green light (to 500-550 nm),<sup>33,34</sup> observation of the epithelial integrity might be difficult after iontophoresis and could represent, retrospectively, a limitation of our study. Thus, minor injuries of the epithelium layer could be present despite the negative corneal staining. Epithelial mapping with OCT or high-resolution echography could help to understand the phenomenon of riboflavin hot spots observed in rabbits. Thus far, information concerning iontophoresis safety, previously mentioned, were only obtained from corneal tangential cuts with conventional histology and not *en face*.<sup>28-30</sup>

### Next Steps and Questioning for the CXL Quest for Evaluation

Our results provide experimental evidence of the transepithelial (via iontophoresis) stiffening by the combined action



of UV-A light with riboflavin in an in vivo rabbit model. However, it remains unknown how long this stiffening effect can be maintained. In addition, we do not know if the dominant mechanism of the clinical efficacy of CXL is an architectural reinforcement of the cornea by the way of instantaneous collagen fibers polymerization (corneal stiffening) or rather a long-term biological healing process occurring within months after CXL (epithelial and superficial collagen fiber anchoring renewal, new arrangements of the keratocyte network after keratocyte loss, renew of superficial nervous plexus in "epithelium off" CXL, etc.).<sup>35,36</sup> In that way, TE-CXL evaluation in subphysiologic conditions is useful since epithelial healing cannot be considered as a confounding factor for clinical demonstration of photopolymerization in CXL efficacy. It is interesting to mention that this instantaneous photopolymerization effect was, from the beginning of CXL experimental trials, the main rationale to explain CXL clinical efficacy.<sup>37</sup> To our knowledge, only two papers reported extensimetry measurements after C-CXL in a relative long-term, follow-up period. The first one was performed by Spörl et al.<sup>38</sup> in 16 rabbits' eyes with timeline euthanizations at 1 month ( $n=11$ ) and 3 months ( $n=8$ ). The second one was published by Wollensak et al.<sup>39</sup> in nine rabbits at 1, 2, and 3 months ( $n=3$  for each period). Recently, Ford et al.<sup>40</sup> described a corneal elastography technique based on speckle tracking with OCT that could be possible for future in vivo CXL longitudinal studies. Many studies about microstructural changes after CXL have been published, but the correlation between structural changes and biomechanical properties were neither clearly established nor conducted in the in vivo situation.<sup>21,41,42</sup> Unfortunately, to date, there is no way to clinically follow collagen architectural changes with time after CXL in living patients. With promising approaches to image the effective in vivo microstructural organization of the corneal collagen network (e.g., second-harmonic generation imaging), the field of in vivo corneal elastography research remains a very important path for understanding the science of CXL.

For these reasons, we believe that SSI technology might be one of the most relevant options for experimental studies in the scope of corneal biomechanics imaging with a realistic hope for future clinical use. Thus, one interesting practical option for in vivo human applications could be to draw the individual corneal elasticity behavior under different load of pressure with the featuring of different parameters such as the slope and the nonlinearity of the rising elasticity values. Furthermore, the corneal elastic anisotropy induced by CXL could be an interesting biomechanical parameter to evaluate. Finally, to overcome present technologic limitations, upcoming developments will aim to upgrade the probe frequency and to couple our system with OCT.

## CONCLUSIONS

Collagen cross-linking is a complex and multifactorial process where biomechanical changes are expected to be a highly valuable indicator related to the associated clinical efficacy in retarding keratoconus progression. Our study highlights biomechanical changes induced by I-CXL under precisely controlled conditions (pressure, hydration, and thickness). As a main result, corneas treated with I-CXL exhibited a sharper stiffening under pressure rise than control corneas. More extensive studies are needed in the future to further evaluate this relationship. We think that SSI monitoring could be considered as a valuable option for the independent assessment and titration of the photopolymerization process occurring with in vivo TE-CXL.

## Acknowledgments

The authors thank Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), 1034 unit (Thierry Couffinhal, MD), and the Département de Techniques et de Recherches Chirurgicales Appliquées unit (Jean Claude Le Huec, MD, PhD) for their help with animal housing and technical support. Also, Pierre Roy, PhD, for his support with iontophoresis technology understanding.

Supported by grants from the French National Agency for the Research (ANR Microelasto) for the funding of this project.

Disclosure: D. Touboul, None; J.-L. Gennisson, None; T.-M. Nguyen, None; A. Robinet, None; C.J. Roberts, None; M. Tanter, None; N. Grenier, None.

## References

- Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135:620-627.
- Gkika M, Labiris G, Kozobolis V. Corneal collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A irradiation: a review of clinical and experimental studies. *Int Ophthalmol*. 2011;31:309-319.
- Dhawan S, Rao K, Natrajan S. Complications of corneal collagen cross-linking. *J Ophthalmol*. 2011;869015:1-5.
- Sarraf D, Lee DA. The role of iontophoresis in ocular drug delivery. *J Ocul Pharm*. 1994;10:69-81.
- Tyle P. Iontophoretic devices for drug delivery. *Pharmacol*. 1986;3:318-326.
- Banga A, Chien YW. Iontophoretic delivery of drugs: fundamentals, developments and biomedical applications. *J Control Release*. 1988;7:1-24.
- Eljarrat-Binstock E, Frucht-Pery J, Domb AJ. Iontophoresis for ocular drug delivery. In: Touitou E, Barry BW, eds. *Enhancement in Drug Delivery*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2007:549-571.
- Costello C, Jeske AH. Iontophoresis: applications in transdermal medication delivery. *Phys Ther*. 1995;75:554-563.
- Selinger E. Iontophoresis with contact lens type and eyecup electrodes. *Arch Ophthalmol*. 1947;38:645-653.
- Frucht-Pery J, Mechoulam H, Siganos CS, Ever-Hadani P, Shapiro M, Domb A. Iontophoresis-gentamicin delivery into the rabbit cornea, using a hydrogel delivery probe. *Exp Eye Res*. 2004;78:745-749.
- Yoo SH, Dursun D, Dubovy S, et al. Iontophoresis for the treatment of paecilomyces keratitis. *Cornea*. 2002;21:131-132.
- Horwath-Winter J, Schmut O, Haller-Schober EM, Gruber A, Rieger G. Iodide iontophoresis as a treatment for dry eye syndrome. *Br J Ophthalmol*. 2005;89:40-44.
- Tanter M, Touboul D, Gennisson JL, Bercoff J, Fink M. High-resolution quantitative imaging of cornea elasticity using supersonic shear imaging. *IEEE Trans Med Imaging*. 2009;28:1881-1893.
- Nguyen TM, Aubry JE, Touboul D, et al. Monitoring of cornea elastic properties changes during UV-A/riboflavin-induced corneal collagen cross-linking using supersonic shear wave imaging: a pilot study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:5948-5954.
- Schumacher S, Oeftiger L, Mrochen M. Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin and ultraviolet radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:9048-9052.
- Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, Caporossi T, Caporossi A. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg*. 2009;35:893-899.



17. Costello CT, Jeske AH. Iontophoresis: applications in transdermal medication delivery. Iontophoresis: applications in transdermal medication delivery. *Phys Ther.* 1995;104:1-11.
18. Greenstein SA, Fry KL, Hersh PS. In vivo biomechanical changes after corneal collagen cross-linking for keratoconus and corneal ectasia: 1-year analysis of a randomized, controlled, clinical trial. *Cornea.* 2012;31:21-25.
19. Doughty MJ. The cornea and corneal endothelium in aged rabbit. *Optom Vis Sci.* 1994;71:809-818.
20. Werner L, Chew J, Mamalis N. Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. *Vet Ophthalmol.* 2006;9:281-291.
21. Tan HY, Chang YL, Lo W, et al. Characterizing the morphologic changes in collagen crosslinked-treated corneas by Fourier transform-second harmonic generation imaging. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39:779-788.
22. Armstrong BK, Lin MP, Ford MR, et al. Biological and biomechanical responses to traditional epithelium-off and transepithelial riboflavin-UVA CXL techniques in rabbits. *J Refract Surg.* 2013;29:332-341.
23. Banga AK, Bose S, Ghosh TK. Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts. *Int J Pharm.* 1999;179:1-19.
24. Xiangchen T, Haiqun Y, Yong Zhang, et al. Role of corneal epithelium in riboflavin/ultraviolet-a mediated corneal cross-linking treatment in rabbit eyes. *Biomed Res Int.* 2013; 624563:1-6.
25. Nguyen TM, Couade M, Bercoff J, Tanter M. Assessment of viscous and elastic properties of sub-wavelength layered soft tissues using shear wave spectroscopy: theoretical framework and in vitro experimental validation. *IEEE Trans Ultra Ferroelect Preq Control.* 2011;58:2305-2315.
26. Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33:516-521.
27. Bikbova G, Bikbov M. Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin. *Acta Ophthalmol.* 2013; 15:1-5.
28. Behar-Cohen F, Parel JM, Pouliquen Y, et al. Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced uveitis in rats. *Exp Eye Res.* 1997;65:533-545.
29. Grossman RE, Chu DF, Lee DA. Regional ocular gentamycin levels after transcorneal and transcleral iontophoresis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:909-916.
30. Frucht-Pery J, Mechoulam H, Sigalos CS, Ever-Hadani P, Shapiro M, Domb A. Iontophoresis-gentamicin delivery into the rabbit cornea, using a hydrogel delivery probe. *Exp Eye Res.* 2004;78:745-749.
31. Sun M, Moore TA, Song PS. Molecular luminescence studies of flavins. The excited states of flavins. *J Am Chem.* 1972;94: 1730-1740.
32. Kellogg RE, Bennett RG. Radiationless intermolecular energy transfer. Determination of phosphorescence efficiencies. *J Chem Phys.* 1964;41:3042-3045.
33. Koziol J. Studies on flavins in organic solvents. Spectral characteristics of riboflavin, riboflavin tetrabutylate and lumichrome. *Photochem Photobiol.* 1966;5:41-54.
34. Seybold PG, Gouterman M, Callis J. Calorimetric, photometric and lifetime determinations of fluorescence yields of fluorescein dyes. *Photochem Photobiol.* 1969;3:229-242.
35. Mazzotta C, Caporossi T, Denaro R, et al. Morphological and functional correlations in riboflavin UV-A corneal collagen cross-linking for keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2012;90:259-265.
36. Touboul D, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal confocal microscopy following conventional, transepithelial, and accelerated corneal collagen cross-linking procedures for keratoconus. *J Refractive Surg.* 2012;28:769-776.
37. Beshtawi IM, O'Donnell C, Radhakrishnan H. Biomechanical properties of corneal tissue after ultraviolet-A-riboflavin cross-linking. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39:451-462.
38. Spörl E, Schreiber J, Hellmund K, Seiler T, Knuschke P. Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen. *Ophthalmologie.* 2000;97:203-220.
39. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol.* 2009;87:48-51.
40. Ford MR, Dupps WJ, Rollins AM, Roy AS, Hu Z. Method for optical coherence elastography of the cornea. *J Biomed Opt.* 2011;16:016005.
41. Bueno JM, Gualda EJ, Giakoumaki A, Pérez-Merino P, Marcos S, Artal P. Multiphoton microscopy of ex vivo corneas after collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52: 5325-5331.
42. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen by riboflavin/UVA. *Cornea.* 2004;23:503-507.

# Monitoring of Cornea Elastic Properties Changes during UV-A/Riboflavin-Induced Corneal Collagen Cross-Linking using Supersonic Shear Wave Imaging: A Pilot Study

Thu-Mai Nguyen,<sup>1</sup> Jean-François Aubry,<sup>1</sup> David Touboul,<sup>2</sup> Mathias Fink,<sup>1</sup> Jean-Luc Gennisson,<sup>1</sup> Jeremy Bercoff,<sup>3</sup> and Mickael Tanter<sup>1</sup>

**PURPOSE.** Keratoconus disease or post-LASIK corneal ectasia are increasingly treated using UV-A/riboflavin-induced corneal collagen cross-linking (CXL). However, this treatment suffers from a lack of techniques to provide an assessment in real-time of the CXL effects. Here, we investigated the potential interest of corneal elasticity as a biomarker of the efficacy of this treatment.

**METHODS.** For this purpose, supersonic shear wave imaging (SSI) was performed both ex vivo and in vivo on porcine eyes before and after CXL. Based on ultrasonic scanners providing ultrafast frame rates (~30 kHz), the SSI technique generates and tracks the propagation of shear waves in tissues. It provides two- and three-dimensional (2-D and 3-D) quantitative maps of the corneal elasticity.

**RESULTS.** After CXL, quantitative maps of corneal stiffness clearly depicted the cross-linked area with a typical 200-μm lateral resolution. The CXL resulted in a  $56\% \pm 15\%$  increase of the shear wave speed for corneas treated in vivo ( $n = 4$ ).

**CONCLUSIONS.** The in vivo CXL experiments performed on pigs demonstrated that the quantitative estimation of local stiffness and the 2-D elastic maps of the corneal surface provide an efficient way to monitor the local efficacy of corneal cross-linking. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:5948–5954) DOI: 10.1167/iops.11-9142

UV-A/riboflavin-induced corneal collagen cross-linking (CXL) has been proposed over the last decade as a treatment for keratoconus.<sup>1,2</sup> This minimally invasive technique is expected to stop the progression of keratoconus and hence to avoid or postpone corneal keratoplasty. It consists in photo-reticulating the collagen fibers of the cornea in order to stiffen the corneal structure. The cornea is soaked with a photosensitizer (riboflavin) and then exposed to UV-A illumination. Ex vivo tensile tests on cornea strips were

performed to estimate the elasticity variations induced by CXL.<sup>3</sup> Clinical trials have been conducted in vivo.<sup>4,5</sup> The in vivo efficiency of the CXL is usually estimated by measuring different parameters such as the patient's visual acuity, corneal topography, and corneal keratometry over a few years after the treatment every 3 or 6 months.

This therapeutic approach suffers from a lack of techniques to provide an assessment of the biomechanical effects of the treatment. Whereas current indicators are focused on morphologic measurements, the use of mechanical properties as an in vivo indicator of treatment efficiency still needs to be investigated. The ocular response analyzer (ORA; Reichert, Depew, NY) was proposed to correlate the corneal elasticity with the corneal hysteretic response to applanation forces.<sup>6</sup> But this technique failed to demonstrate significant changes after CXL.<sup>7</sup> In this study, we propose supersonic shear wave imaging elastography (SSI) as a real-time and noninvasive ultrasound-based method to assess the corneal elasticity variations induced by CXL. Elastography is an emergent technique for medical diagnosis. Various techniques have been developed to recover the viscoelastic properties of a biological tissue by measuring its response to a mechanical stimulus. In the case of shear wave imaging,<sup>8</sup> the stimulus is the ultrasonic radiation force, which induces a transient shear wave propagating in the tissue. The shear wave propagation speed is linked to the shear modulus of the tissue. The particularity of the SSI method lies in the use of an ultrafast ultrasound scanner to image the shear wave propagation at a very high frame rate (up to 30,000 frames per second) in order to measure its speed. The ability of SSI elastography technique to assess the biomechanical properties of the cornea has been demonstrated in previous studies.<sup>9</sup> Here, CXL experiments combined with SSI elastography monitoring were conducted ex vivo and in vivo on porcine eyes.

## MATERIALS AND METHODS

### Corneal Collagen Cross-Linking

UV-A/riboflavin-induced CXL has been introduced in the last decade as an in vivo cornea stiffening method. Cross-links between the collagen fibrils can be induced by photo-polymerization, leading to a stiffer fiber network.

The CXL protocol is based on three steps. First, the epithelium is removed from the central part of the cornea so that the cornea becomes permeable. Then, riboflavin solution (riboflavin 0.1% dextran T500 20%; Horus Pharma, Saint-Laurent du Var, France) is dropped on the cornea (1 drop/min for 30 minutes) in order to enable the corneal stroma to absorb the UV-light emission without damaging the deeper structures (endothelium, lens, retina). Finally, the cornea is exposed to UV-light-emitting diodes (wavelength 370 nm, intensity 3 mW/cm<sup>2</sup>;

From the <sup>1</sup>Institut Langevin Ondes et Images, ESPCI ParisTech, Paris, France; the <sup>2</sup>Centre Hospitalo-Universitaire de Bordeaux, Centre National de Référence pour le Kératocône (CNRK), Bordeaux, France; and <sup>3</sup>SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France.

Supported by the French National Research Agency (ANR MicroElasto).

Submitted for publication November 23, 2011; revised June 21, 2012; accepted July 25, 2012.

Disclosure: T.-M. Nguyen, None; J.-F. Aubry, None; D. Touboul, None; M. Fink, None; J.-L. Gennisson, None; J. Bercoff, SuperSonic Imagine (E); M. Tanter, SuperSonic Imagine (C).

Corresponding author: Thu-Mai Nguyen, 1 rue Jussieu, 75005 Paris, France; thu-mai.nguyen@espci.fr.



IOVS, August 2012, Vol. 53, No. 9

IROC Medical, Zurich, Switzerland) for 30 minutes while riboflavin drop is continued (1 drop every 5 minutes). In our experiments, the diameter of the irradiated area was set to 8 mm.

### Supersonic Shear Wave Imaging

Young's modulus ( $E$ ) of a homogeneous tissue can be retrieved from the speed ( $c_T$ ) of a shear wave propagating in this tissue:

$$E = 3\rho c_T^2, \quad (1)$$

where  $\rho$  is the tissue density.

The SSL is an ultrasound-based elastography technique based on Equation 1. It is a combination of the generation of a plane shear wave into the tissue using the ultrasonic radiation force and of ultrafast ultrasonic imaging to the propagation of the shear wave in the tissue.

An ultrafast scanner (Aixplorer; SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) is used to drive a standard ultrasonic probe (linear array, 128 elements, 15 MHz) by per-channel programming in both transmit and receive. First, the ultrasonic beam is focused for a few tens of microseconds in the tissue to induce a transient axial displacement (Fig. 1a). The tissue relaxation generates a shear wave, which is propagating perpendicularly to the ultrasonic pushing beam axis. Then the probe is switched to the ultrafast imaging mode: the tissue is imaged at a very high frame rate (up to 30,000 frames per second) during the shear wave propagation (Fig. 1b). These two steps are repeated at different locations in order to map the entire cornea. As illustrated on Figure 1c, four pushing beams are applied at different abscissae along the cornea curvature. Each pushing beam is followed by an ultrafast imaging sequence.

Figure 2 shows the axial displacements that are induced by the ultrasonic radiation force in the cornea. The magnitude of these displacements is typically a few micrometers. The shear wave speed is deduced by cross-correlating the images of the displacement field.

In the case of layered organs, the shear wave is guided along the layer by the successive reflections on the layer boundaries. This guided wave phenomenon results in dispersive effects that must be taken into account to recover the shear modulus. As shown in previous studies,<sup>9,10</sup> the dispersion curve can be approximated by

$$v_\phi(\omega) = \sqrt{\frac{bc_T\omega}{2\sqrt{3}}}, \quad (2)$$

where  $v_\phi$  is the phase velocity of the shear wave,  $\omega$  is the angular frequency of the shear wave,  $b$  is the layer thickness, and  $c_T$  is the intrinsic shear wave speed of the organ.

The phase velocity is defined as the speed of a single-frequency component of the shear wave. In our experimental configuration, the 15-MHz ultrasonic pushing beam induces a broadband shear wave (typically 200–1500 Hz). In this article, we express the results in terms

### Monitoring of Cornea Elastic Property Changes 5949

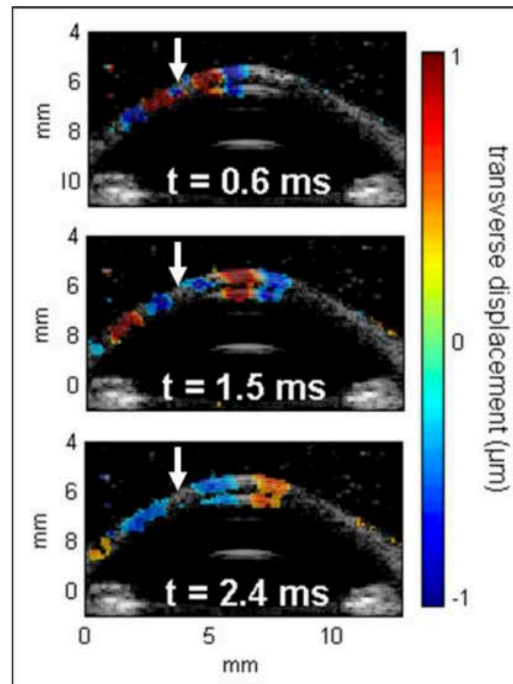


FIGURE 2. Snapshots of the shear wave propagation in a porcine cornea. The ultrasonic radiation force is applied at  $t = 0$  ms at the location indicated by the white arrow. The resulting axial displacements are superimposed to the echographic image. The color scale corresponds to the amplitude of these displacements (red, toward the probe; blue, downward).

of group velocity, which corresponds to the speed of the whole shear wave packet.

### Statistical Analysis

A statistical analysis was performed on the results of the ex vivo CXL experiments. A one-way ANOVA was applied to differentiate the successful treatments from the unsuccessful ones. ANOVA gives the probability ( $P$  value) of the null hypothesis that several samples are drawn from populations with the same mean. Thus, if a low  $P$  value is

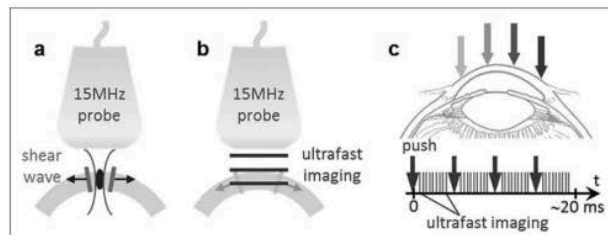
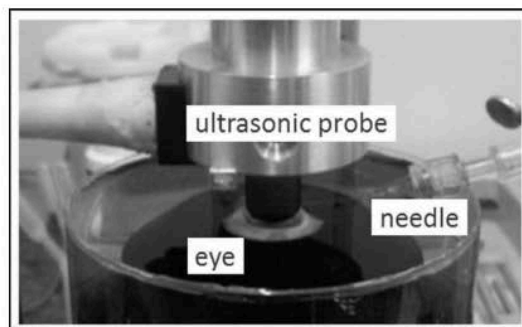


FIGURE 1. Supersonic shear wave imaging principle. (a) First, a shear wave is induced in the cornea using the ultrasonic radiation force. (b) Second, the probe is switched to an ultrafast imaging mode (up to 30,000 frames per second) in order to follow the shear wave propagation. (c) In order to map the entire cornea, four pushing beams are applied successively at different locations. The pushing beams are interleaved with ultrafast imaging sequences.



**FIGURE 3.** Experimental setup for ex vivo SSI acquisitions. The eyeball is immersed in water. A needle is inserted in the anterior chamber to regulate the IOP. The ultrasonic probe (15 MHz, 128 elements) is placed a few millimeters above the cornea.

obtained, the null hypothesis is rejected (i.e., the samples are significantly different).

**Ex Vivo Corneal Cross-Linking Experiments.** We first tested our elastography monitoring protocol on ex vivo eyes. Freshly excised porcine eyeballs were obtained from a slaughterhouse (Etablissements Guy Harang, Paris, France) a few hours postmortem. The eyeballs were kept refrigerated in physiological saline solution. The experiments were performed within 48 hours after enucleation.

In order to be close to physiological conditions, we performed a monitoring of the IOP. A needle was inserted in the anterior chamber and linked to a digital manometer (AZ 8215; Bioseb, Vitrolles, France). Physiological saline solution was injected in the anterior chamber to adjust and maintain the IOP to  $20 \pm 0.4$  mm Hg.

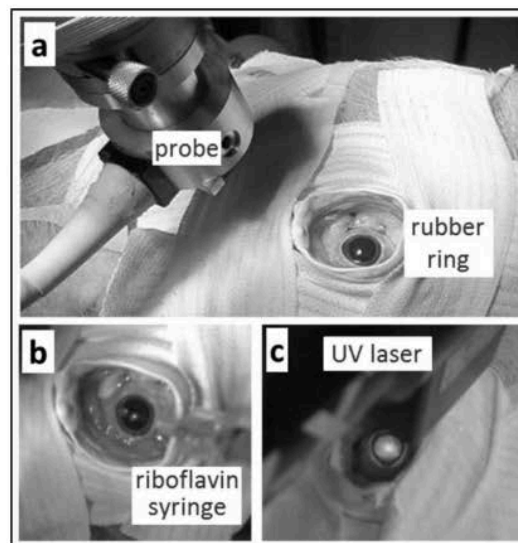
For  $n = 9$  eyes, elastography acquisitions were performed before the treatment and after de-epithelization and riboflavin application (control group). For  $n = 17$  eyes, elastography acquisitions were performed before and after a complete CXL procedure (de-epithelization, riboflavin application, and UV exposure).

During the elastography sequences, the eyeballs were immersed in a water tank, and the probe was placed above the cornea as shown in Figure 3. During the riboflavin instillation and the UV-A-exposure steps, water was pumped out of the tank and the ultrasonic probe was translated upward without changing the eyeball position.

**In Vivo Corneal Cross-Linking Experiments.** In vivo experiments were conducted on porcine eyes ( $n = 4$ ) at the Institut Mutualiste Montsouris Research unit (IMM Recherche, Paris, France) after validation by the local ethics committee. The pigs were under general anesthetic and mechanical ventilation. All the animals were treated in accordance with the ARVO statement for the use of animals for ophthalmic and vision research.

The animal eyelids were maintained open using a palpebral speculum. A rubber ring was used to form a small hermetic water tank around the animal ocular orbit. The ring was strapped on the head of the pig. The ultrasonic probe was mounted on an articulated arm. Elastography acquisitions were performed before and after the CXL treatment. During the elastography acquisitions, the tank was filled with physiological saline solution, and the probe was placed above the cornea. The in vivo experimental setup is shown in Figure 4.

The central corneal thickness was measured before and after CXL using a pachymeter (SP 100; Tomey, Nagoya, Japan). We minimized as much as possible the undesirable motions of the cornea: the head was strapped to the operating table; and we triggered the elastography acquisitions with both the respiratory cycle and the cardiac cycle, in order to avoid global displacements caused by the respiration or the pulsatility.



**FIGURE 4.** Experimental setup for in vivo acquisitions on anesthetized pigs. (a) A rubber ring is placed around the eye to enable the cornea immersion during elastography acquisition. (b) Riboflavin 0.1% is dropped on the cornea for 20 minutes. (c) The cornea is exposed to UV-A light for 30 minutes.

After the in vivo experiments, the animal was euthanized, and the eyeballs were collected. Ex vivo SSI acquisitions were then performed on the enucleated eyeballs. We performed three-dimensional (3-D) scans of the cornea by rotating the probe above the cornea using a dedicated mounting. Elastic maps of the corneal surface were reconstructed from acquisitions in different imaging planes (from  $0^\circ$  to  $180^\circ$  by steps of  $5^\circ$ ; i.e., 37 imaging planes).

## RESULTS

### Ex Vivo CXL

Figure 5 shows an example of the images that can be obtained on an intact enucleated eye using a 15-MHz linear array. The intact ex vivo cornea exhibits a homogeneous shear wave speed ( $2.0 \pm 0.2$  m/s).

CXL was applied ex vivo on a total of 17 eyes. For these treated eyes, the elasticity was measured before and after the CXL. A control group was composed of 9 eyes for which the elasticity was measured before and after both epithelium removal and riboflavin application. For the control group, no significant change of the corneal elasticity was observed (variation of  $-2\% \pm 15\%$  of the shear wave speed). For five of the treated eyes, significant corneal stiffening after CXL was observed (increase of  $60\% \pm 20\%$  of the shear wave speed). On the other corneas, the elasticity did not increase after treatment and even decreased in some cases (shear wave speed variation of  $-20\% \pm 20\%$ ).

Figure 6 shows the shear wave speed variations obtained in the responsive group ( $n = 5$  over 17 treated eyes) compared with the control group ( $n = 9$ ). Both groups are significantly different ( $P < 4.10^{-5}$ ). This  $P$  value was obtained using one-way ANOVA to validate the discrimination between both groups.

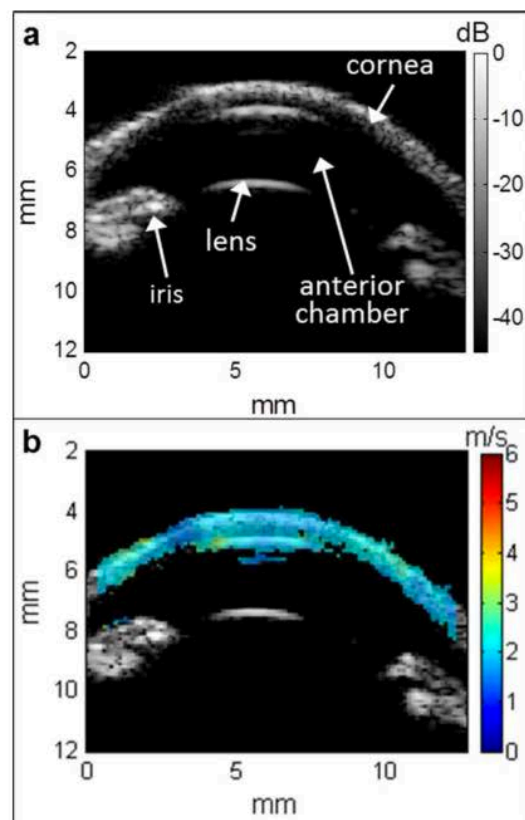


FIGURE 5. (a) B-mode image of an ex vivo porcine cornea acquired with a 15-MHz linear array. (b) Elastic map of an ex vivo porcine cornea, obtained using SSL, superimposed on the B-mode image. The color scale corresponds to the shear wave group velocity (m/s).

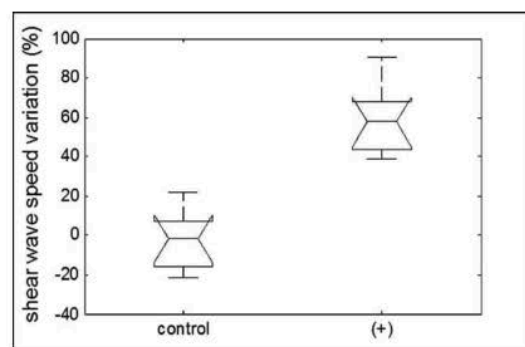


FIGURE 6. Elasticity increase induced by CXL corneas. The control group was de-epithelized and soaked with riboflavin but not exposed to UV irradiation ( $n = 9$ ). The (+) group corresponds to corneas that were responsive to the CXL treatment ( $n = 5$ ). Both groups are significantly different ( $P < 4.10^{-5}$ ).

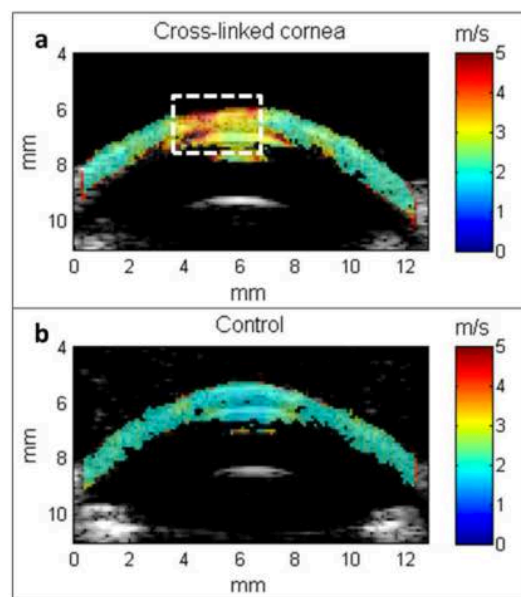


FIGURE 7. Ex vivo elastic maps acquired on porcine corneas superimposed on the echographic image. The color scale corresponds to the shear wave group velocity (m/s). A CXL was performed in vivo on the central part (delineated by the white dashed line) of the left cornea (a), while the right eye (b) of the same animal remained untreated. The color scale corresponds to the shear wave group velocity (m/s).

### In Vivo CXL

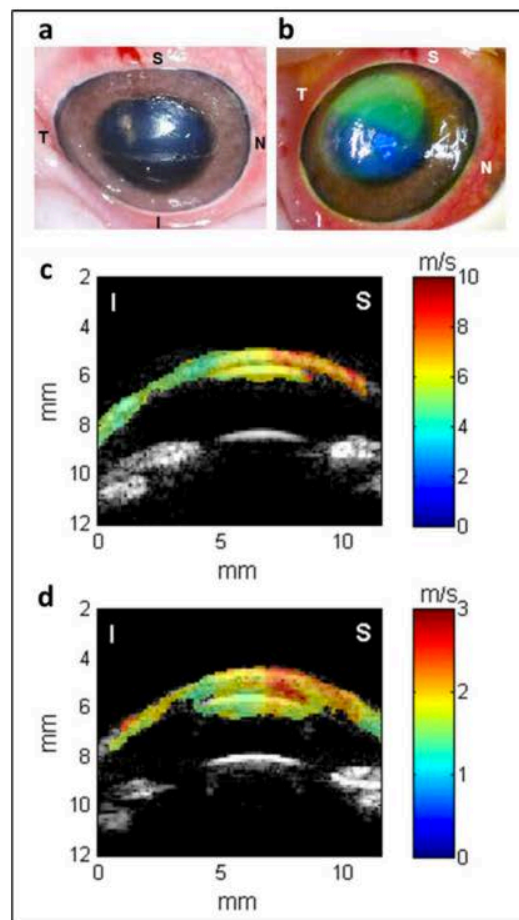
To avoid ex vivo biases, we performed CXL in in vivo conditions on anesthetized pigs. A total of  $n = 4$  porcine eyes were treated in vivo.

Figure 7 shows the elastic maps obtained on a pair of eyes belonging to the same animal after enucleation. The values of the shear wave speed are superimposed on the echographic images. CXL was applied in vivo on the left eye, while the right eye remained untreated and was used as a control. The control cornea (Fig. 7b) exhibits a homogeneous elasticity ( $2.0 \pm 0.2$  m/s). On the treated cornea (Fig. 7a), two areas can be distinguished. The central part (delineated by the white dashed line), corresponding to the UV-A-beam localization, is stiffer ( $3.4 \pm 0.5$  m/s) than the peripheral part ( $2.1 \pm 0.1$  m/s). Furthermore, the elasticity in the peripheral part (not exposed to UV-A-illumination) is close to the elasticity of the control cornea.

The results obtained on another porcine cornea are presented in Figure 8. As illustrated in Figure 8a, the epithelium was removed only on the superior half of the cornea. During the UV-A-exposure, a higher light intensity was observed on the de-epithelized area than on the epithelized area (Fig. 8b). The riboflavin appears with a fluorescent-green color when illuminated by UV-A light; the more riboflavin absorbed, the more intense the green color. Thus, we can conclude that the riboflavin is mainly absorbed in the de-epithelized area.

Figure 8c shows an elastic map of the cornea acquired in vivo after the CXL. The imaging plane is aligned along the inferior-superior meridian of the cornea. In this cross-section, the right part (S indicates superior) is stiffer than the left part (I



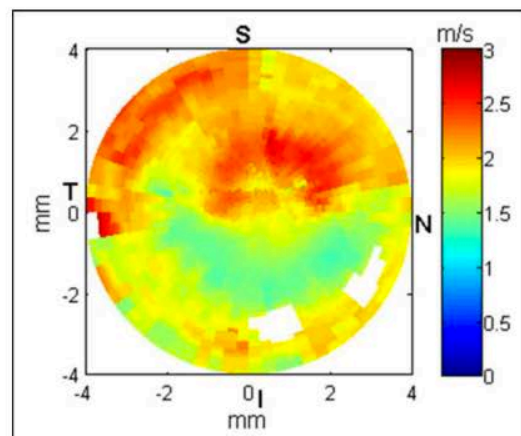


**FIGURE 8.** (a) In vivo porcine cornea after unilateral epithelium removal (superior half of the central 8 mm of the cornea). (b) In vivo porcine cornea during the UV-A exposure (8-mm diameter beam). (c) Elastic map of one cross-section of the cornea acquired in vivo after CXL. (d) Elastic map acquired ex vivo after enucleation on the same cornea. Anatomic marks are reported on each figure (S, superior; I, inferior; T, temporal; and N, nasal). The imaging plane shown in (c) and (d) is aligned along the inferior-superior meridian. The color scale in (c) and (d) corresponds to the shear wave group velocity (m/s).

indicates inferior): the shear wave speed median values are  $6.7 \pm 0.3$  m/s and  $5.1 \pm 0.2$  m/s, respectively. The SD corresponds to the spatial heterogeneity.

Figure 8d shows an elastic map of the same cornea acquired ex vivo on the enucleated eyeball a few hours post mortem. The shear wave speed is globally lower than in the in vivo cornea because the IOP is much lower in ex vivo conditions. Again, the imaging plane is aligned along the inferior-superior meridian of the cornea. The shear wave speed median values are  $2.1 \pm 0.1$  m/s in the right part (superior side) and  $1.7 \pm 0.1$  m/s in the left part (inferior side).

We obtained an ex vivo elastic map of the surface of the cornea from the acquisition of different imaging planes (Fig. 9). For each point, the shear wave speed was averaged over the



**FIGURE 9.** Ex vivo elastic map of the surface of the cornea after a CXL had been performed in vivo on the superior half on the cornea. The color scale corresponds to the shear group velocity (m/s). For each point, the shear wave speed has been averaged on the whole cornea thickness.

whole corneal thickness. On this map, the superior half of the cornea appears significantly stiffer ( $2.17 \pm 0.05$  m/s) than the inferior half ( $1.60 \pm 0.02$  m/s). The geometrical position of the stiffer area matches the de-epithelized area.

The results obtained on  $n = 4$  corneas unilaterally treated are summarized in the Table. For these four cases, the shear wave speed difference between the treated area and the untreated area was  $56\% \pm 15\%$  (the SD corresponds to the variability between the different experiments).

## DISCUSSION

In this work, we used SSI elastography technique to measure the effect of CXL on the mechanical properties of porcine corneas.

First, it is important to note that the IOP has a major influence on the corneal elasticity, as shown by prior inflation tests on porcine eyeballs combined with SSI elastography (Nguyen T-M, unpublished data, 2010). The corneal elasticity increases nonlinearly with the IOP. An IOP variation of 3 or 4 mm Hg induces a significant modification of the corneal elasticity that can be detected with SSI elastography. The IOP was thus set to  $20 \pm 2$  mm Hg for all ex vivo experiments.

We started our study with ex vivo CXL experiments. Only 29% of the treated corneas exhibited significant stiffening ( $60\% \pm 20\%$  of the shear wave speed) after CXL. Figure 6 shows a clear separation between the corneas that were affected by the CXL and those that were not affected by this treatment. We suspected the ex vivo conditions would introduce biases in the experiments. In particular, in ex vivo conditions, the stroma does not ensure the water content regulation, as opposed to in vivo conditions. Moreover, the cornea is highly permeable because of the epithelium removal. Since the ultrasound measurements require a total immersion of the sample, a non-negligible amount of water can penetrate the corneal stroma. This phenomenon was confirmed by pachymetric measurements (SP 100, Tomey) performed at the beginning and at the end of the experiments. The initial central corneal thickness (CCT) was  $891 \pm 152$   $\mu$ m for all the samples. The final CCT



TABLE. Results Obtained for  $n = 4$  Corneas Treated In Vivo by CXL\*

No.	In Vivo CCT ( $\mu\text{m}$ ), SD = $\pm 50 \mu\text{m}$		Untreated Area		Treated Area		$v_g$ Variation (%)	$E$ Variation (%)
	Initial	Final	$v_g$ (m/s), Median $\pm$ SD	$E$ (kPa), Median $\pm$ SD	$v_g$ (m/s), Median $\pm$ SD	$E$ (kPa), Median $\pm$ SD		
1	618	614	$2.1 \pm 0.1$	$71 \pm 14$	$3.4 \pm 0.5$	$487 \pm 287$	62	586
2	554	500	$1.7 \pm 0.2$	$30 \pm 14$	$2.9 \pm 0.3$	$258 \pm 107$	70	760
3	782	724	$2.00 \pm 0.02$	$58 \pm 2$	$3.00 \pm 0.06$	$295 \pm 24$	49	409
4	700	710	$1.60 \pm 0.02$	$24 \pm 2$	$2.17 \pm 0.05$	$81 \pm 7$	36	238

$v_g$ , shear group velocity.

\*The central corneal thickness was measured before and after CXL. The shear group velocity was measured on the ex vivo elastic maps in both treated and untreated areas. The SD corresponds to the spatial heterogeneity of each area. For cases Nos. 1 and 2, the values were deduced from one elastic cross-section (only one imaging plane was acquired). For cases Nos. 3 and 4, the values were deduced from elastic maps of the corneal surface (3-D scans were performed).

was  $994 \pm 183 \mu\text{m}$ . Such an edema might accelerate the tissue degradation and disturb the CXL process. The pigs also underwent hot steam at the slaughterhouse, which might result in superficial coagulation on the collected corneas. Nevertheless, some corneas (29%) exhibited significant stiffening after CXL. The distinction between successful and unsuccessful treatments could be due to differences in the postmortem degradation of the tissue properties before the CXL experiments. We did not find any correlation between the initial CCT and the CXL efficiency. But many parameters in our ex vivo protocol might affect the CXL efficiency, such as changes in collagen interfibrillar distance induced by collagen degradation. Thus, to avoid these unknown parameters that clearly affected the efficacy of corneal CXL, we performed in vivo CXL experiments on anesthetized pigs.

Elastic cross-section maps were acquired in vivo after the treatment, and 3-D elastography scans (acquisitions of different cross-sections) were performed ex vivo on the enucleated eyes. We compared the ex vivo elastic cross-section maps of pairs of eyes coming from the same animal. On each animal, one eye was treated by CXL, while the other one remained untreated. We clearly observed a stiffened area on the treated cornea. Therefore, we demonstrated the ability of the SSI elastography technique to visualize the stiffening effect of CXL.

Besides, the stiffened area corresponds to the UV-A-beam localization. Outside of the laser focal spot, the elasticity of the treated cornea was similar to that of the untreated cornea. Thus, we showed that the CXL stiffening effect is localized on the UV-A spot. We performed a set of unilateral in vivo CXLs: the epithelium was removed only on the superior half of the cornea. We observed that the UV-A absorption was maximal on the de-epithelized area. This observation is consistent with high-performance liquid chromatography performed by other groups to measure the stromal concentration of riboflavin with and without epithelium removal.<sup>11</sup> This result underlines the importance of the epithelium removal during the CXL procedure. The ex vivo elastic maps obtained after unilateral in vivo CXL exhibited a higher shear wave speed in the treated area than in the untreated area. The geometrical shape and localization of the stiffer area corresponds to the de-epithelized area.

On the four cases investigated, the shear wave speed was  $56\% \pm 15\%$  (inter-experiments variability) higher in the treated area than in the untreated area (Table). This value is comparable with the ratio obtained in the successful ex vivo CXL experiments. However, the significant variability between the different corneas emphasizes the necessity to monitor the CXL.

Case No. 4 (Table) is the example shown in this article (Fig. 8). For this case, the shear wave speeds measured ex vivo in

treated and untreated regions ( $2.17 \pm 0.05$  m/s and  $1.60 \pm 0.02$  m/s, respectively) correspond to the respective stiffness values of  $81 \pm 7$  kPa and  $24 \pm 1$  kPa. These values are deduced from Equation 2, linking the mechanical wave speed and the local stiffness in a guided elastic plate. For these estimations, the thickness was measured on the B-mode images ( $b = 1 \text{ mm} \pm 50 \mu\text{m}$  for both areas) and the central frequency (500 Hz) was deduced from the Fourier transform of the displacement field.

The corneal elasticity measurements reported here are averaged over the entire corneal thickness. Indeed, in our experimental conditions, the radiation force is applied in an area that has an axial length of typically  $700 \mu\text{m}$  up to  $1 \text{ mm}$ . Thus, we observed an effect of the CXL that is averaged over the entire corneal thickness.

Experimental improvements must be done to obtain in vivo 3-D scans. Indeed, several imaging planes must be acquired to perform such a scan for a given position of the cornea. In the present study, the anesthesia of the pigs induced uncontrollable motions such as global rotation of the eyeball. From the perspective of clinical applications, a solution to keep the eyeball in a given position consists of asking the patient to focus on a luminous target.

Previous studies have shown that the viscosity of soft tissues can also be measured using SSI.<sup>10,12</sup> The corneal viscosity can be deduced from the estimation of the shear wave attenuation. Further studies will be conducted to investigate the feasibility and clinical relevancy of corneal viscosity assessment.

## CONCLUSIONS

This study demonstrates the feasibility of using SSI for the in vivo monitoring of CXL. SSI elastography provided, to our knowledge, the first in vivo experimental evidence of the corneal biomechanical changes induced by CXL. CXL was applied in vivo on anesthetized pigs. Elastic maps of the cornea were obtained after treatment in both ex vivo and in vivo conditions. On these maps, the treated area was clearly delineated and exhibited significant stiffening compared with the untreated area ( $56\% \pm 15\%$ ). Three-dimensional scans provide elastic maps of the corneal surface, enhancing the visualization of the treated area. This technique seems promising for the in vivo monitoring of CXL efficiency as it could be performed immediately after the treatment. Further studies will investigate the usefulness of SSI in performing preoperative diagnosis. Three-dimensional elastic maps of the cornea could help the management of keratoconus or improve the planning of refractive surgery procedures.

# Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency (ANR MicroElasto). The authors are grateful to the IMM research group (Paris, France; in the public domain at [www.imm-recherche.com](http://www.imm-recherche.com)) for their support and fruitful discussions. The authors would also like to thank the slaughterhouse Etablissements Guy Harang (Paris, France) for providing enucleated porcine eyes.

# References

1. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res.* 1998;66:97-103.
2. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea.* 2007;26:385-389.
3. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29:1780-1785.
4. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2003;135:620-627.
5. Caporossi A, Mazotta C, Baiocchi S, Caporossi T. Long-term results of riboflavin ultraviolet A corneal collagen cross-linking for keratoconus in Italy: the Siena eye cross study. *Am J Ophthalmol.* 2010;149:585-593.
6. Luce DA. Determining in vivo biomechanical properties of the cornea with an ocular response analyzer. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31:156-162.
7. Goldich Y, Barkana Y, Morad Y, Hartstein M, Avni I, Zadok D. Can we measure corneal biomechanical changes after collagen cross-linking in eyes with keratoconus? A pilot study. *Cornea.* 2009;28:498-502.
8. Sarvazyan AP, Rudenko OV, Swanson SD, Fowlkes JB, Emelianov SY. Shear wave elasticity imaging: a new ultrasonic technology of medical diagnosis. *Ultrasound Med Biol.* 1998;24:1419-1435.
9. Tanter M, Touboul D, Gennisson JL, Bercoff J, Fink M. High resolution quantitative imaging of cornea elasticity using supersonic shear imaging. *IEEE Trans Med Imaging.* 2009;28:1881-1893.
10. Nguyen T-M, Couade M, Bercoff J, Tanter M. Assessment of viscous and elastic properties of sub-wavelength layered soft tissues using shear wave spectroscopy: theoretical framework and in vitro experimental validation. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2011;58:2305-2315.
11. Baiocchi S, Mazotta C, Cerretani D, Caporossi T, Caporossi A. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg.* 2009;25:893-899.
12. Defieux T, Montaldo G, Tanter M, Fink M. Shear wave spectroscopy for in vivo quantification of human soft tissues visco-elasticity. *IEEE Trans Med Imaging.* 2009;28:313-322.

# High Resolution Quantitative Imaging of Cornea Elasticity using Supersonic Shear Imaging

M. Tanter<sup>1\*</sup>, D. Touboul<sup>2</sup>, Jean-Luc Gennisson<sup>1</sup>, Jeremy Bercoff<sup>3</sup> and Mathias Fink<sup>1</sup>

**Abstract**— The non invasive estimation of in vivo mechanical properties of cornea is envisioned to find several applications in Ophthalmology. Such high-resolution measurements of local cornea stiffness could lead to a better anticipation and understanding of corneal pathologies such as Keratoconus. It could also provide a quantitative evaluation of corneal biomechanical response after corneal refractive surgeries and a tool for evaluating the efficacy of new cornea treatments such as cornea transplant using femtosecond laser or therapy based on Riboflavin/UltraViolet-A Corneal Cross Linking (UVA CXL). In the very important issue of glaucoma diagnosis and management, the fine tuning corneal elasticity measurement could also succeed to strongly correlate the applanation tonometry with the “true” intra ocular pressure (IOP). This initial investigation evaluates the ability of ultrafast and high resolution ultrasonic systems to provide a real-time and quantitative mapping of corneal viscoelasticity. Quantitative elasticity maps were acquired ex vivo on porcine cornea using the Supersonic Shear Imaging technique (SSI). A conventional 15 MHz linear probe was used to perform conventional ultrasonic imaging of the cornea. A dedicated ultrasonic sequence combines the generation of a remote palpation in the cornea and ultrafast (20000 frames per second) ultrasonic imaging of the resulting corneal displacements that evolve into a shear wave propagation whose local speed was directly linked to local elasticity. A quantitative high resolution map (150  $\mu\text{m}$  resolution) of local corneal elasticity can be provided by this dedicated sequence of ultrasonic insonifications. Quantitative maps of corneal elasticity were obtained on ex vivo freshly enucleated porcine corneas. In the cornea, a quite homogenous stiffness map was found with a 190 kPa  $\pm$  32 kPa mean elasticity. The influence of photodynamic Riboflavin/UVA induced CXL was measured. A significant Young's modulus increase was obtained with a mean 890 kPa  $\pm$  250 kPa post-treatment Young's modulus (460% increase), located in the anterior part of the cornea. Simulations based on 3D time domain finite differences simulation were also performed and

found to be in good agreement with ex vivo experiments. The Supersonic Shear imaging technique can perform real-time, non invasive, high resolution and quantitative maps of the whole corneal elasticity. This technique could be real time and straightforward adapted for a very wide field of in vivo investigations.

## I. INTRODUCTION

IN the past decade, Ultrasound-based Elastography became a major research topic in the medical ultrasound community. Researchers postulated that information about tissue mechanical properties would represent an interesting added value either to conventional B-mode ultrasound imaging or MRI imaging. Ultrasound-based methods assessing viscoelastic properties of tissue are studied for many diagnostic applications such as breast cancer diagnosis [1,2], liver fibrosis staging [3,4,5], arterial wall [6,7] and cardiac muscle elasticity imaging [8,9]. These techniques are also envisioned for the monitoring of thermal ablation using high intensity focused ultrasound [10]. Whereas most proposed Ultrasound-based approaches are limited to a qualitative assessment of tissue stiffness, a method based on the use of ultrafast echographic scanners able to reach very high frame rates (higher than thousand images per second) enables the assessment of the local and quantitative value of tissue Young's modulus  $E$  [11-14]. The very high frame rate enables the transient and real time imaging of shear mechanical vibrations induced deep inside organs using the radiation force of an ultrasonic beam [15]. In homogeneous media, the local propagation speed  $c_s$  of the resulting shear waves is directly linked with stiffness defined as Young's modulus  $E$  via the theoretical relation  $E=3\rho c_s^2$  where  $\rho$  is the tissue density (assumed to be constant in soft tissue, typically 1000 kg/m<sup>3</sup>). This method called Supersonic Shear Imaging was recently applied for breast cancer diagnosis [2] with promising results. Its in vivo applicability for the quantitative imaging of liver stiffness [16] and musculoskeletal system [17] was also recently validated.

In ophthalmology, the assessment of visco-elastic properties of cornea could also provide very valuable information for various applications [18]. Indeed, it could provide a powerful tool for evaluating the efficacy of new cornea treatments such as cornea transplant using femtosecond laser [19,20] or therapy based on Riboflavin/UltraViolet-A corneal cross

Manuscript received January 26, 2009; revised April 6<sup>th</sup>, 2009. Asterisk indicates corresponding author.

\*M. Tanter is with the Langevin Institute (CNRS UMR 7587), ESPCI, Inserm, Paris, France (phone: +33 1 40795167; fax: +33 1 40794468; e-mail: mickael.tanter@espci.fr).

D. Touboul is with the Ophthalmology Department, Centre Hospitalo-Universitaire, Bordeaux, France.

J.-L. Gennisson and M. Fink are with the Langevin Institute (CNRS UMR 7587), ESPCI, Paris, France.

J. Bercoff is with Supersonic Imagine Company, 13857 Aix en Provence, France.

Copyright (c) 2009 IEEE. Personal use of this material is permitted. However, permission to use this material for any other purposes must be obtained from the IEEE by sending a request to pubs-permissions@ieee.org

linking (UVA CXL) [21]. Another potential application could be the quantitative evaluation of the corneal biomechanical response after photo-ablative laser surgeries or cutting relaxant corneal procedures. It could be envisioned for an early clinical detection of corneal ectatic disease [22,23] or improved accuracy of intraocular pressure (IOP) measurement [24,25]. Perhaps even more promising, it could also lead to a better management of corneal pathologies such as Keratoconus [26] and to the estimation of risk factors due to abnormal mechanical properties of cornea before refractive surgery (screening of the infra clinical Keratoconus form fruste). Refractive surgery techniques such as Laser-Assisted in Situ Keratomileusis (LASIK) are currently encountering a huge success with considerable growth in terms of annual procedures. A misunderstanding of the corneal biomechanics properties can lead to over-corrections or under-corrections of corneal refractive photo ablative procedures. More important, even if this complication is very rare, the dramatic case of post laser excimer ectasia (PLE) should be prevented [27]. It is important to mention that in the case of extreme PLE, the use of intra corneal rings or, in worst case, a keratoplasty would be necessary to restore useful vision in these usually young patients.

The precise and quantitative assessment of corneal elasticity (Young's Modulus) is crucial to ensure the safety of LASIK refractive surgery, as the corneal final shape results from the relaxation of the cornea tissue up to a new equilibrium curvature state after cutting a flap of anterior corneal tissue. This new equilibrium state is strongly affected by corneal tissue elasticity. Thus, any technological approach that could provide a reliable and quantitative 3D mapping of corneal structure Young's modulus would offer new insights in refractive surgery procedures. To date, the assessment of cornea Young's modulus was mainly performed *ex vivo*. In vivo applications are usually limited to the estimation of technique-dedicated parameters linked to stiffness but not to stiffness itself [28]. Recently, Hollman et al proposed an ultrasound-based system for strain imaging of corneal tissue [18]. This Ultrasound Elasticity Microscope provided very promising images of strain induced by a compression plate on the corneal surface of *ex vivo* porcine eye. This device corresponds to the application of Static Elastography proposed twenty years ago by J. Ophir and collaborators [29] to the domain of high frequency ultrasound. However, the deduction of quantitative estimates of local Young's modulus from the knowledge of the strain field provided in Static Elastography is a very complex task which is not properly solved to date at least for practical clinical applicability. Surface wave elastometry was also recently proposed in order to assess cornea mechanical properties [30].

A system based on the generation of non contact transient air-pulse and an dynamic electro-optical system used to record two applanation pressure measurements at the surface of the cornea [31] was recently proposed and named Ocular Response Analyzer (ORA- Reichert- USA). It is still today the only technology available for the *in vivo* corneal

biomechanical evaluation. However, despite a very ingenious system, the ORA was not yet proven to characterize with a good predictability the biomechanical normality of the cornea. The estimated parameter called Corneal Hysteresis (CH) corresponds to the difference of pressure levels at which the applanation of corneal surface is reached during inward and outward corneal displacement. It is linked to the time needed for the corneal displacement at air pulse location to reach a given value during inward and backward motion. Although presented as an estimation of corneal viscous damping, this parameter is linked in a complex way to several geometrical (corneal thickness) and viscoelastic properties (Young's modulus  $E$  and shear viscosity  $\eta$ ) of cornea and this could explain the limited predictability of the system. Indeed, the generation of an air pulse at the surface of the cornea induces the generation of a shear mechanical wave that travels in a few milliseconds along the entire corneal wall. Estimating the underlying visco-elastic properties of the propagation medium from these displacements requires a refined imaging and analysis of the shear wave propagation. By estimating only two applanation pressures at a single location on the cornea, the ORA cannot fully resolve the inverse problem of this shear wave propagation and recover direct estimates of physical biomechanical parameters such corneal elasticity or viscosity. Finally the attainment of applanation requires high cornea displacements (higher than 1 mm), resulting undoubtedly into nonlinear behavior of cornea response to a mechanical stress.

On the contrary, the SSI modality induces only micrometric displacements (much lower than cornea thickness), thus insuring a linear behaviour of the cornea tissue. Moreover, instead of estimating only the slope of inward and backward displacement at the transient pushing location, the SSI technique images a complete two dimensional movie of the displacement field in the corneal layer at an ultrafast frame rate. This set of data is much more complete and contains the required information that enables recovering precisely the local shear wave speed in the cornea.

For corneal stiffness estimation, the relation between Young's modulus and shear wave speed is more complex than the well known  $E=3\rho c_s^2$  formula. Indeed, contrary to large organs such as breast or liver, where boundary conditions do not affect significantly shear wave propagation, the cornea plate is thin (typically 1mm) compared to the shear wavelength. Moreover, there is a strong contrast between shear velocities in the the Cornea and the surrounding media. Cornea (typical Young's modulus of several hundreds of kPa) is surrounded on one side by the aqueous humor (viscous liquid with nearly 0 kPa Young's modulus) and on the other side by a coupling liquid during the experimental investigation (Young's modulus = 0 kPa). As a consequence, when shear waves propagate along cornea, strong reflections and mode conversions at these interfaces generate partially guided wave propagation. The propagation of elastic waves in infinite and thin elastic plates, known as Lamb waves [41], has been extensively investigated and extended to the case of cylindrical shells [42]. Lamb waves propagate with specific



modes that have highly dispersive behaviors but in the very low frequency range, only one symmetric (S0) and one anti-symmetric (A0) modes are found. For thin elastic plates in vacuum, a low frequency analytical approximation has been established for the phase velocity  $c(\omega)$  of the mode A0 [43]:

$$c(\omega) = \sqrt{\frac{\omega h c_s}{\sqrt{3}}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $\omega$  is the angular frequency,  $h$  the plate thickness,  $c_s$  the shear wave speed given by the Young's modulus  $E$  and the volumic mass  $\rho$  of the plate, via the relation  $c_s = \sqrt{E/3\rho}$ .

However, when the plate is surrounded by liquids or soft solids instead of vacuum, it becomes more difficult to derive an analytical formula of type Eq. 1, due to the fact that the small contrast in longitudinal velocities of the different materials (around 1500 m/s  $\pm$  5 %) generates a total leakage of the longitudinal wave at the wall interfaces ("leaky" Lamb wave), where as the shear part is totally reflected at both interfaces and remains trapped inside cornea. Recently, Pernot et al. [44] proposed an empirical analytical formula that approximates with a good accuracy the phase velocity of a leaky Lamb wave propagating in the arterial wall (i.e. in the case of soft tissues surrounded by liquid media). This formula is similar to the classical Lamb wave equation (Eq.1) but corrected by a factor  $1/\sqrt{2}$ :

$$c(\omega) = \sqrt{\frac{\omega h c_s}{2\sqrt{3}}} \quad (1)$$

Thus, it is possible to deduce the Young's modulus from the knowledge of the shear dispersion curve  $c(\omega)$  and local thickness  $h$  of the cornea. This frequency dependency of the shear wave speed can be estimated using the SSI modality [34].

To date, in our knowledge, this manuscript proposes a first clinically applicable technique for the *in vivo* imaging of the quantitative Young's modulus of the cornea with a very high resolution. This quantitative elasticity imaging mode is performed using conventional high frequency ultrasonic probes and can thus be implemented on ultrafast scanners providing both stiffness and ultrasonic images.

## II. MATERIALS AND METHODS

### A. Experimental Setup

The Supersonic Shear Imaging technique is based on the use of conventional ultrasonic probes. For applying this modality in ophthalmology, a 15 MHz linear array (Vermon,

France) is used. The array is made of 128 elements with a 0.205 spatial pitch and a 12 mm elevation focus. Fresh excised postmortem porcine eyes obtained from the slaughterhouse are placed in a positioning cap immersed into a small water tank. In all experiments, the intra ocular pressure of the ex-vivo eyes was at atmospheric pressure. The linear array is immersed in water and positioned 5 mm above the cornea surface as described in figure 1.

The probe is driven by an ultrasound research prototype (V1 System developed by Supersonic Imagine, Aix en Provence, France) made of 128 programmable transmit channels (70 peak-to-peak Transmit Voltage, 25 kHz maximal Pulse Repetition Frequency) and 64 multiplexed received channels (10 Bits Dynamics, 100 dB Time Gain Amplification).

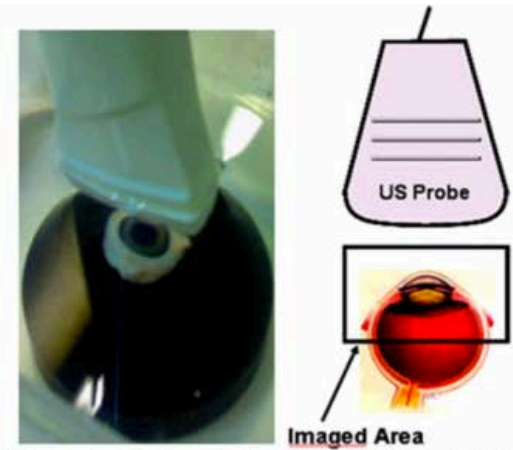


Fig. 1. Experimental Setup: A 1D linear array (128 elements, 16 MHz) is imaging the ex vivo freshly enucleated porcine eye. The echographic probe, eye porcine eye and the eye holder are immersed into pure water.

### B. Imaging Methods

The *in vivo* SSI mode was described in details in [2]. It consists of a remote palpation induced by the radiation force of a focused ultrasonic beam (typically 100  $\mu$ s long burst), the so called "pushing beam", (Figure 2a, red arrow). Each "pushing beam" generates a remote vibration that results in the propagation of a transient shear wave (Figure 2a, blue arrows) [32]. After generation of this shear wave, an ultrafast echographic imaging sequence is performed in order to acquire successive raw radio-frequencies (RF) data at a very high frame rate. Contrary to conventional ultrasonography where an image is achieved using line by line transmit focused beams (typically 50 frames per second), ultrafast echographic images are achieved by transmitting a single quasi-plane ultrasonic wave in tissues and achieving the beamforming process only in the receive mode. The quasi-plane terminology stands for the fact that the transmitted ultrasonic wavefront is planar in the 2D imaging plane and slightly

diffracting along the probe elevation direction beyond the elevation focal distance. Thus, for ultrafast imaging, the frame rate is only limited by the time of flight of ultrasonic waves. For ophthalmologic applications, the imaging depth does not exceed 20 mm. It corresponds to a typical  $27 \mu\text{s}$  time of flight that defines a maximal frame rate of 37000 frames per second. In our experiments, the frame rate was set to 20000 frames per second.

Before entering into the SSI mode, the device is functioning as a conventional echographic device (transmit/receive beamforming at 50 frames per second). A typical echographic image of *ex vivo* porcine eye is presented in figure 2b. The cornea is clearly visible in the echographic image. The operator is first asked to position the desired locations of three pushing beams using a cursor on the real time echographic

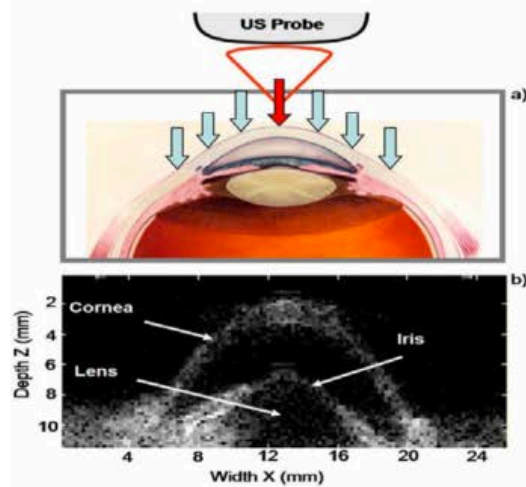


Fig. 2. a) The echographic probe emits an ultrasonic focused beam that generates a localized radiation force (red arrow) at the surface of the cornea. Resulting shear waves (blue arrows) propagate in the cornea on both side of the pushing location. b) Conventional B-mode Echographic image of an *ex vivo* porcine eye acquired before the generation of the ultrasonic radiation force.

images. These pushing beams have to be positioned at the left, center and right parts of the cornea (figure 3). Then, a first SSI sequence is performed using the left “pushing” beam and an ultrafast ultrasonic sequence is performed in order to catch the resulting corneal displacements. The total experiment lasts 3 ms (60 frames acquired at a 20000 Hz frame rate). This first sequence (pushing beam n°1, figure 3) allows elasticity imaging on the right side of the pushing line location. Just at the end of this first sequence, a second SSI sequence (pushing beam n°2, figure 3) is performed with the central “pushing” beam. Finally, a third sequence is performed with a right “pushing” beam (pushing beam n°3, figure 3). The pushing modes n°1 and 3 enable elasticity imaging in the middle of the imaging plane whereas the pushing mode n°2 enable elasticity imaging on the edges of the imaged area. The total acquisition time for a complete mapping of cornea elasticity lasts 12 ms

(3x4 ms). For practical clinical configurations, this ultra-short acquisition time will prevent the influence of any motion artifacts or natural motion such as arterial pulsatility.

### C. Safety Considerations

In order to meet the FDA (Food and Drug Administration) requirements for ophthalmologic applications, the acoustic intensities have been strongly decreased in comparison with other organs such as breast [2], liver [16] or muscle [17]. The acoustic intensity induced during the SSI sequence remained lower than the recommendations provided by the FDA for

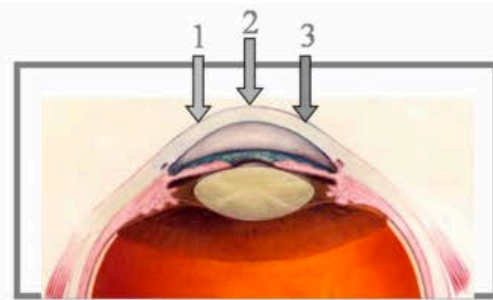


Fig. 3. The SSI imaging mode. Three successive pushing beams are transmitted and focused on the left, center and right part of the cornea surface (locations n° 1, 2, 3). After each “push”, the ultrasonic scanner images the resulting transient displacement by entering into an ultrafast frame rate during 3 ms. The total acquisition time for imaging the three generated shear waves is no longer than 12 ms.

Ultrasonic imaging devices (510k recommendations). The methodology used for the measurements is described in the paragraph 4.6.1 « Acoustic Output Reporting » of these recommendations [33].

TABLE I. ACOUSTIC PARAMETERS USED IN THE SSI MODALITY COMPARISON WITH THE 510(K) FDA RECOMMENDATIONS FOR ULTRASOUND DIAGNOSTIC IMAGING SYSTEMS

Sequences	Mechanical Index		I <sub>SPTA</sub> (mW/cm <sup>2</sup> )	
	Worst case measurement	510k FDA Limits	Worst case measurement	510k FDA Limits
Shear wave generation	0.21 <sup>1</sup>	0.23	2.2	17
Ultrafast imaging	0.08	0.23	0.13	17
Global SSI sequence	-	-	2.33	17

For these *ex vivo* investigations, each “pushing” beam is typically focused between 6 and 12 mm depth. Each focused insonification lasts 30  $\mu\text{s}$  for the generation of the “pushing” radiation force. Typically, it corresponds to 1000 sinusoids at 15 MHz. This results in a total of 90  $\mu\text{s}$  insonification for the *in vivo* generation of a complete data set for stiffness imaging.

<sup>1</sup> This M.I. value corresponds here to 0.82 MPa at a 15 MHz central frequency.



The acoustic pressure levels and intensities were measured using a calibrated AH-2020 hydrophone (OndaCorp, Sunnyvale, CA 94089, USA, 0.1 mm resolution, frequency bandwidth ranging from 1 to 25 MHz). Measurements were made in water. For these measurements, the acoustic parameters were estimated at the “worst” focal distance (corresponding to the elevation focus  $z = 12$  mm). These parameters correspond respectively to the Mechanical Index (M.I.) and the Spatial Peak Time Averaged Intensity ( $I_{SPTA}$ ), as defined in the FDA recommendations [33]. All values were not derated in order to take into account the worst case corresponding to a pushing and elevation focus

configuration chosen for the acoustic parameter measurements, the SSI mode fulfils the requirements of the 510 (k) FDA recommendations. The total  $2.33 \text{ mW/cm}^2 I_{SPTA}$  value for a single elasticity image acquisition per second is much lower than the  $17 \text{ mW/cm}^2$  FDA limit. A maximal frame rate of 7 elasticity frames per second could even be performed while respecting the FDA guidelines.

#### D. Post processing of raw data for quantitative imaging of the shear wave group velocity

Raw RF data are transferred via a PCI Xpress bus on a PC board. Signal processing is then divided into the following steps:

1. Receive beamforming of the raw RF data acquired in order to produce flat transmit echographic images.
2. One dimensional (1D) speckle tracking using conventional 1D cross-correlation of successive echographic images for the building of 128 images of tissue relative displacements (along the  $z$ -axis, fig. 1). Relative displacement means tissue displacement between two successive ultrafast echographic images. Consequently, it corresponds to a local tissue particle velocity (in m/s). Out-of-line motion are negligible as tissue displacements along the ultrasonic beam path are typically ten times higher than the ones in transverse directions.
3. Local assessment of the mechanical shear wave speed  $c_s$  by means of a time of flight estimation between two points during the shear wave propagation. This time of flight estimation is based on the cross-correlation of local displacement time profiles recorded at two different locations along the  $s$ -axis (fig. 4 dashed white line) corresponding to a curvilinear line that follows the cornea curvature. Lateral distance between the two measurement points along this line corresponds typically to 8 times the inter-element spacing of the linear probe (i.e.  $8 \times 0.2 \text{ mm} \sim 1.6 \text{ mm}$ ). By estimating a time of flight between two wideband shear displacement signals, this algorithm performs an averaged estimate of the shear wave group velocity over the whole shear wave bandwidth. In a locally homogeneous medium, the Young's modulus  $E$  is then directly linked to shear wave speed  $c_s$  via the relation  $E = 3\rho c_s^2$ , where  $\rho$  is the density. In the case of cornea, this relationship does not hold anymore as the mechanical wave is constrained and guided in a plate (i.e. the cornea) thinner than the shear wavelength. However, a slightly more complex relationship relating shear wave speed and the Young's modulus can be derived by considering the leaky Lamb wave theory.

Recombination of the shear wave speed image obtained with the pushing mode n°1, 2 and 3, (fig. 3). The local wave speed can be converted into the local Young's modulus value as described in the next subsections.

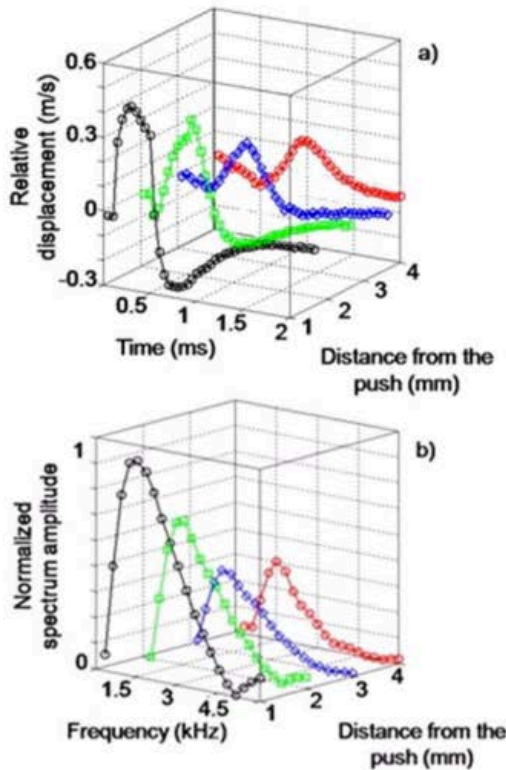


Fig. 4. a) Typical experimental waveforms of the shear relative displacement profile (displacement from frame to frame at a PRF 20.000 Hz) obtained in ex vivo porcine eyes (displacement for different locations at one given depth in the cornea as a function of time (Fig. 4a) for an increasing distance from the “pushing location”). b) Corresponding spectra for each shear waves displacement profile presented on Fig. 4a.

simultaneously located exactly at the external surface of the cornea. The results corresponding to the acquisition of one elasticity image per second (i.e. 3 pushes each lasting 30  $\mu\text{s}$  and 3x60 ultrafast images) for this worst pushing case are summarized in table I.

It can be seen in table I that the ultrafast imaging mode is characterized by a very low  $I_{SPTA}$  value as it does not imply any focusing in the transmit mode. Finally, even in the worst



### E. Analysis of shear wave dispersion for quantitative recovery of Young's modulus

A more detailed analysis of the local mechanical behavior of the cornea can be performed using a shear wave spectroscopy algorithm as previously described by Deffieux *et al* [34]. This approach corresponds to the determination of shear wave phase velocity dispersion over a large frequency range. The large bandwidth of the shear wave generated through the ultrasonic radiation force allows this kind of measurement in one single acquisition sequence. Whereas the shear wave spectroscopy analysis can be performed in a typical 100 to 500 Hz in deep organs like breast or abdominal organs), the bandwidth of the shear wave generated by the ultrasonic beam radiation force is much larger in the cornea application. Figure 4a shows typical waveforms of the shear velocity profile obtained in *ex vivo* porcine eyes at one given depth in the cornea as a function of time (Fig. 4a) for an increasing distance from the "pushing location". Figure 4b shows the corresponding frequency spectrum. It appears that the use of a 15 MHz linear array (generating a remote palpation on an approximate 0.2 mm diameter sharp beam) enables exploiting a very large 500-3000 Hz bandwidth contrary to deeper organs like breast or liver where the upper limit of the bandwidth is limited to 500 Hz [34,16]. Such very high shear wave frequencies can only be reached due to the sharpness of the ultrasonic beams generated by very high frequency ultrasonic probes.

The Fourier transform of these signals is then computed. At each frequency, the dependence of the phase versus propagation distance is extracted. The last step consists applying a linear fitting to this phase function in order to retrieve the wave number  $k$  for each frequency and consequently the phase speed of the shear wave at each frequency. One has thus access to the shear wave dispersion curve.

### F. Estimation of Young's modulus from Leaky Lamb wave guided propagation in the cornea

Due to the dispersion induced by the guided propagation into the cornea, the conversion of shear wave speed into a quantitative Young's modulus mapping can be deduced by reformulating equation 2 into the form:

$$E = 36 \frac{\rho c(\omega)^4}{h^2 \omega^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

By using cornea thickness and the central frequency of the mechanical wave spectrum as entry parameter, equation 3 provides the Young's modulus value from the estimated mechanical wave speed. As an example or a typical  $c = 5.1$  m/s propagation and a 1500 Hz central frequency excitation in a 1.2 mm thick cornea, one retrieves  $c_s = 7.96$  m/s corresponding to  $E = 190$  kPa Young's modulus of the cornea.

### G. Simulations

In order to corroborate experimental results, the 3D

displacement field induced by the ultrasonic radiation force in the cornea was also fully modeled using a three dimensional discretization of the elastodynamic continuity equations. The model is based on a first-order finite-difference time-domain (FDTD) algorithm for elastodynamic equations. The implemented scheme is based on a staggered grid technique initially introduced by Virieux for applications in Seismology [35]. Perfectly matched layers [36] were also implemented at the boundaries of the 3D mesh volume in order to avoid unwanted reflections of the propagating waves. The medium is considered to be elastic, isotropic, non dissipative. It is discretized into a rectangular volume made of  $550 \times 300 \times 550$  points. Each grid voxel is defined by its local density, shear wave speed and bulk wave speed (linked directly to mechanical shear and bulk moduli).

TABLE II. MECHANICAL PARAMETERS FOR 3D SIMULATIONS

	Density ( $\text{kg.m}^{-3}$ )	Shear Wave Speed ( $\text{m.s}^{-1}$ )	Stiffness $E$ (MPa)
<b>Cornea</b>			
Simulation N°1	1000	10	0.3
Simulation N°2	1000	20	1.2
Simulation N°3	1000	25	1.8
<b>Iris</b>	1000	20	1.2
<b>Lens</b>	1000	20	1.2
<b>Sclera</b>	1000	17	0.6
<b>Aqueous humor</b>	1000	0	0
<b>Vitreous humor</b>	1000	0.2	$10^{-4}$

Table II summarizes the physical parameters chosen for the FDTD simulations. The Bulk wave speed was 1500 m/s in all tissues. Aqueous humor was considered as a liquid. Although few and sometimes contradictory values were available in the literature, the chosen parameters were found both to corroborate several reported values and to agree with the typically obtained experimental results [37,38]. Figure 5

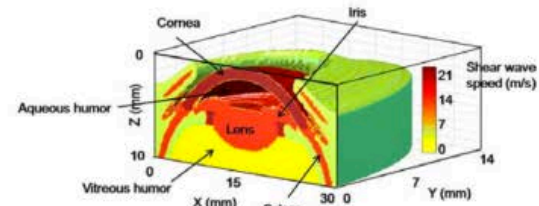


Fig. 5. 3D spatial distribution of the shear wave speed  $c$ , (corresponding to the local Young's modulus  $E$  via  $E = 3\rho c_s^2$ ) used in the Time Domain Finite differences simulations of the cornea mechanical response using AceF<sup>2</sup>, a package of 3D wave simulation libraries developed at Laboratoire Ondes et Acoustique, Paris, France.

shows a 3D view of the shear wave speed values in the 3D volume. The eye was considered to be immersed in water. Transparent areas of the 3D volume correspond to a zero-valued Young's modulus (i.e. fluid areas).

#### H. Photodynamic Riboflavin/UVA induced corneal collagen cross-linking (CXL)

Keratoconus is an idiopathic corneal dystrophy characterized by progressive thinning and ectasia which results in a decrease of vision and also the quality of life. As the disease begins in young adults, it affects the most productive years of life. A recent modality of treatment, CXL with the help of UVA, 370 nm, and the photosensitizer Riboflavin phosphate 0.1%, has been described which changes the intrinsic biomechanical properties of the cornea. Resulting in the stiffening of the stroma layer of the cornea, this treatment has shown to slow down or prevent the progression of Keratoconus in numerous studies all over the world [39,40].

In our study, fresh postmortem porcine eyes were treated using the following procedure: In order to allow the spreading of the Riboflavin into the cornea, the epithelium (first external layer of the cornea) was gently removed with a smooth spatula. Then, corneas were immersed into 0.1 % Riboflavin (Ricola - Solf - Italy) solution for 15 minutes (with an handmade system of corneal lens recipe). Finally, UVA irradiation was performed for 30 minutes by using a UVA diode laser (370 nm, IROC-Germany) with a focusing spot diameter of 8 mm and constant irradiance of 3 mW/cm<sup>2</sup>. One eye drops of isotonic saline solution (BSS) followed by one eye drop of Riboflavin 0.1% was applied on the cornea every five minutes for respectively hydration and renewal of the photosensibilizer. Young's modulus imaging sequences were performed just before the CXL and at the end of the CXL with the SSI system and corneal elasticity mapping was performed.

### III. RESULTS

#### A. Simulations

The radiation force induced by the ultrasonic beam focused on the cornea surface was introduced as a transient source term in the elastodynamic equations. In order to mimic the typical experimental configuration, the 3D spatial distribution of this transient source term corresponds to a 0.2x0.4x2 mm<sup>3</sup> cigar shape volume in which each pixel generates a force along the z axis. The 0.2 mm dimension corresponds to the lateral resolution of the 1D linear probe. The 0.4 mm resolution corresponds to the beam width in the probe elevation direction (y-axis). As the ultrasonic "pushing" beam along z-axis is roughly equal to 2 mm., it generates an uniaxial force over the entire depth of the cornea. The black ellipse in figure 6a corresponds to the trace of this cigar shape on the cornea surface.

The color maps correspond to the spatial distribution of tissue displacements along the z-axis at the cornea surface for different time steps after the force generation. One can notice

that the slight asymmetry of the pushing beam does not result in any asymmetry of the shear wave propagation that

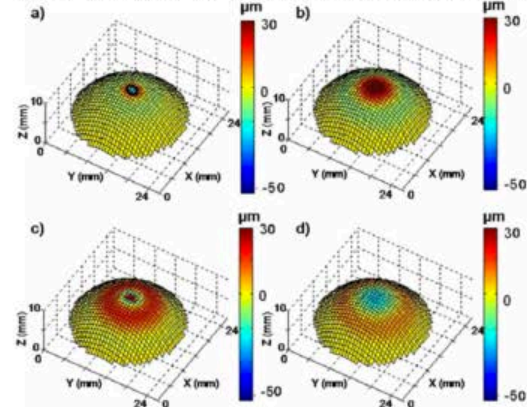


Fig. 6. Spatial distribution of cornea tissue displacements along the z-axis at the cornea surface for different time steps after the force generation: a)  $t = 0.25$ , b)  $t = 0.5$ , c)  $t = 0.75$  and d)  $t = 1$  ms. The color scale ranges between -50 and +30  $\mu\text{m}$ . As local displacements are four orders of magnitudes smaller than the global eye dimensions, the eye curvature can be considered as in a steady state.

propagates with a spherical shape. This is easily explained by the fact that the average wavelength of the generated shear wave is much larger than the source dimensions. Moreover, as local micrometric displacements are four orders of magnitudes smaller than the global eye dimensions, the eye curvature can be considered as stationary. Interestingly, figure 7a and 7b

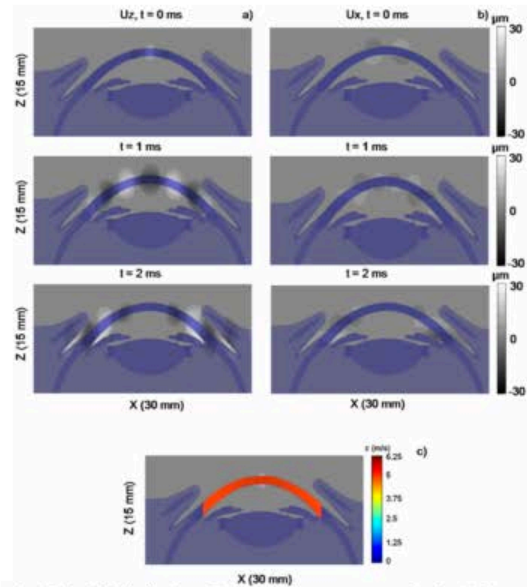


Fig. 7. Spatial distribution of tissue displacements respectively (a) along z and (b) along x axis in a vertical X-Z slice for different time steps after the mechanical force generation. Displacements are ranging from -30  $\mu\text{m}$  to 30  $\mu\text{m}$  in both figures. (c) Shear wave speed map estimated by the time of flight algorithm using z-displacements from figure 7a.



represent for the same simulation the mapping of displacements respectively along  $z$  and  $x$  axis in a vertical  $X$ - $Z$  slice for different time steps after the mechanical force generation. Two points can be noted: first, the displacements along the  $x$ -axis are much smaller (more than ten times) than the displacements along  $z$  direction. The estimation of  $z$ -displacements (i.e. the ones estimated experimentally using the 1D ultrasonic speckle correlation tracking approach) is sufficient to image the whole propagation phenomenon. Secondly, tissue displacements occur not only at the surface but everywhere in depth inside the cornea. Thus, local estimation of the shear wave speed will provide an in depth mapping of the elasticity of cornea.

Figure 7c presents the estimation of the shear wave speed deduced from the time of flight algorithm. A homogeneous map is recovered as expected. However, one should notice that the shear wave speed is much smaller ( $c = 5.3$  m/s  $\pm 0.1$  m/s for a central frequency of the mechanical excitation) than the local parameter introduced in the simulation ( $c_s = 15$  m/s). Indeed, as shear wavelength is of the same order of magnitude than the cornea thickness, this is explained by the fact that the shear wave propagation is guided by the cornea. This guided propagation corresponds to a well known case in Physics, corresponding to the propagation of a leaky Lamb wave in a plate.

#### B. Simulation results : Analysis of shear wave dispersion due to Leaky Lamb wave guided propagation

The dispersion curves for the wave propagation modeled in the FDTD simulation were estimated. For this purpose, the time profile of the shear wave received at each location along a curvilinear line corresponding to a constant depth inside the cornea are analyzed in the Fourier domain. Indeed, the Fourier transform of each time profile enables to estimate at each frequency the phase changes with the propagation distance. The phase of each spectral component is linearly dependent of distance and a linear fit of this dependence enables the

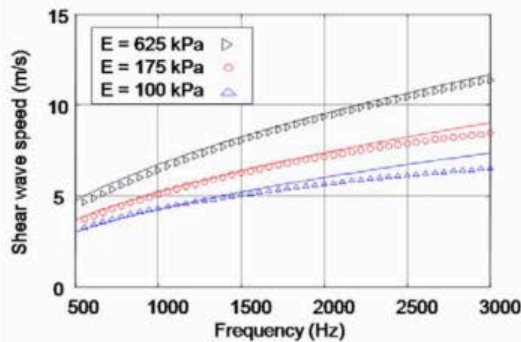


Fig. 8. Shear wave speed dispersion curve obtained from simulated data using three different cornea stiffness ( $E = 100, 175$  and  $625$  kPa corresponding respectively to shear wave speed values  $c_s = 10, 15$  and  $25$  m/s). The solid line corresponds to the analytical formula presented in Equation 2. The cornea stiffness values used in simulations correspond to typical values of cornea stiffness obtained from ex vivo experiments.

estimation of the shear wave speed at each frequency. The corresponding shear wave speed is plotted for each frequency in fig 8. As one can notice the wave propagation is strongly dispersive and the wave phase speed values are in good agreement with the empirical formula proposed in recent works [44].

In the range 500-3000 Hz, this agreement was verified for three different simulations (using three different cornea stiffness corresponding to  $c_s = 10, 15$ , and  $25$  m/s and a fixed cornea thickness). One should here notice that compared to a propagation in free space where the shear wave would

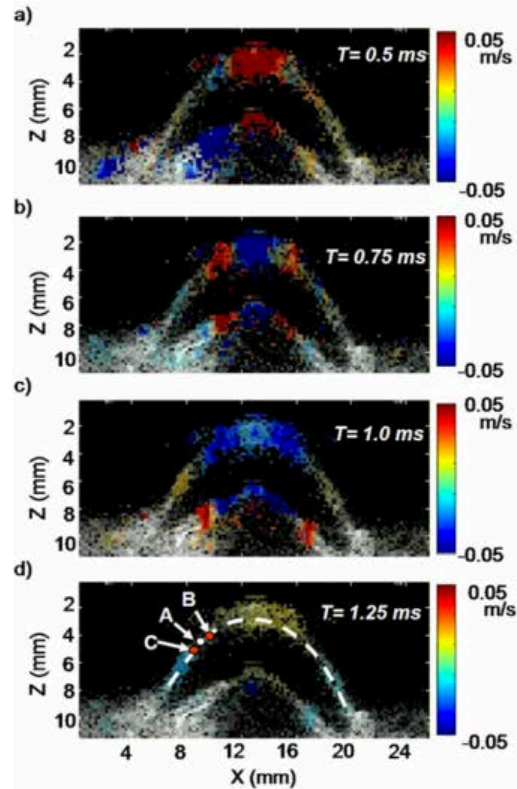


Fig. 9. Images of local corneal tissue relative displacements between successive echographic images (i.e. particle velocity) at different time steps just after the ultrasonic radiation force generated at the center of the cornea. These color relative displacements images depict the shear wave propagation in the cornea and are superimposed on the echographic gray scale image. The resolution of the displacement map is  $150 \mu\text{m}$ .

propagate at  $c_s$ , the cornea plate slows down the mechanical wave (for example in figure 8,  $c = 8.25$  m/s at  $1500$  Hz for a cornea stiffness defined by  $c_s = 25$  m/s). This permits to track the mechanical wave propagation experimentally without requiring to perform huge ultrasonic frame rates.

#### C. Experimental results: quantitative imaging of corneal elasticity

In the total of 6 fresh postmortem porcine eyes, the

ultrasonic probe was found to be able both to induce a shear wave propagating in depth inside the cornea and to image with an ultrafast frame rate (20,000 Hz) the resulting shear relative displacements. The 1D cross-correlation of successive Ultrasound images provides a set of tissue relative displacements. Figure 9 represents the 2D spatial distribution of these tissue relative displacements along z axis at different time steps after the second radiation force generation (central "push" corresponding to sequence n°2 described in figure 3). Displacements occur in all layers of the cornea and the shear wave propagation from center towards cornea edges is clearly visible. Maximal tissue relative displacements of about 0.6 m/s at a 20000 Hz pulse repetition frequency (corresponding to global displacements of about 100  $\mu\text{m}$  after time integration) can be reached while preventing to overtake the FDA safety limitations.

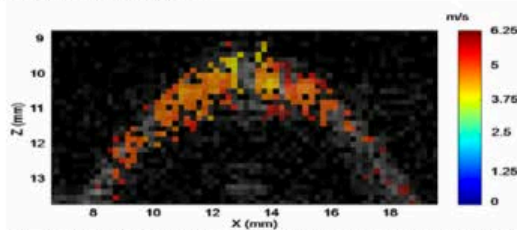


Fig. 10. High resolution 2D map of the shear wave speed superimposed on the gray scale echographic image of the cornea. From the knowledge of the corneal thickness ( $h=1.5$  mm) and central frequency of the mechanical excitation (1500 Hz), this map can be converted into a quantitative Young's modulus map using equation (3). Here, mean wave speed is equal to  $5.1 \text{ m.s}^{-1} \pm 0.2 \text{ m.s}^{-1}$  corresponding to a cornea Young's modulus of  $190 \text{ kPa} \pm 32 \text{ kPa}$ .

Figure 10 presents an example of the post-processing which enables the recovery of the local shear wave group speed along the dashed line presented in figure 9d.

The value of the shear wave speed at point A outside of the pushing zone is obtained by estimating the time delay  $\tau_t$  between time profiles at points B and C surrounding point A. The choice of the distance between B and C is optimized based on the data quality (ie. the signal to noise level of tissue displacements estimates). A high SNR of displacements time profiles enables estimating smaller time delays between signals and consequently reducing the interspace distance between locations used in the time-of-flight algorithm. Typically, in our experiments, this distance corresponds to 4 times the spatial pitch of the array ( $4 \times 0.2 \text{ mm} \sim 0.8 \text{ mm}$ ). This time of flight estimation is performed for each location along each curvilinear line inside the cornea resulting in a 2D mapping of the local shear wave speed in the cornea with a  $150 \mu\text{m}$  resolution. Figure 10 shows the resulting 2D mapping of the cornea obtained using this time of flight algorithm.

#### D. Experimental results : Analysis of shear wave dispersion using shear wave spectroscopy

Shear wave spectroscopy was applied using the experimental data. The time profiles of local z-displacement

recorded at each location along a curvilinear line corresponding to a constant depth inside the cornea (dashed line fig 9d) are displayed on figure 11. The three successive "pushes" on the left, center and right side of the cornea and their resulting propagation are clearly visible.

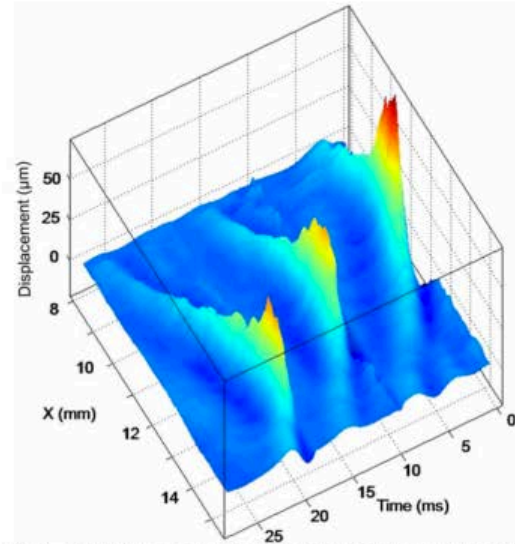


Fig. 11. Time profiles of local z-displacement recorded at each location along a curvilinear line corresponding to a constant depth inside the cornea (dashed line fig 9d). One can clearly distinguish the three successive mechanical wave propagations corresponding to the three successive push locations.

The Fourier transform of each time profile enables to estimate at each frequency the phase changes with the propagation distance. The phase of each spectral component is linearly dependent of distance and a linear fit of this dependence enables the estimation of the shear wave speed at each frequency, see figure 12. The three subplots correspond to estimates for the three successive pushing modes.

Finally, from these data, the corresponding shear wave speed dispersion curves deduced from the three successive pushing mode are plotted in fig 13. The assessment of this frequency dependence of the mechanical wave speed is found to be robust as the three curves are in good agreement. The analytical formula corresponding to eq. 2 with a value  $c_s = 7.9 \text{ m/s}$  (i.e.  $E = 190 \text{ kPa}$ ) is also plotted in figure 13 and fits the experimental data derived from the shear wave spectroscopy analysis.

The agreement between experiments and the analytical dispersion relation is very good especially in the high frequency range ( $>1500 \text{ Hz}$ ). At lower frequency, a discrepancy appears. It is due to two main factors. First, as the wavelength becomes quite large at lower frequency, it is no more negligible compared to the cornea curvature and diffraction due to the spherical shape of the eye can no more be neglected. In terms of Lamb mode propagation, a single A0 mode propagation can no more be considered and contribution



of other modes are present. Secondly, at very low frequency the dispersion curve assessment is disturbed by reflections of the wave on the edges of the cornea. A local point can "feel" the reflected Lamb wave before the end of the incident wavefield. This last point emphasizes the interest provided by the acoustic radiation force that permits generating shear waves with a very high frequency range.

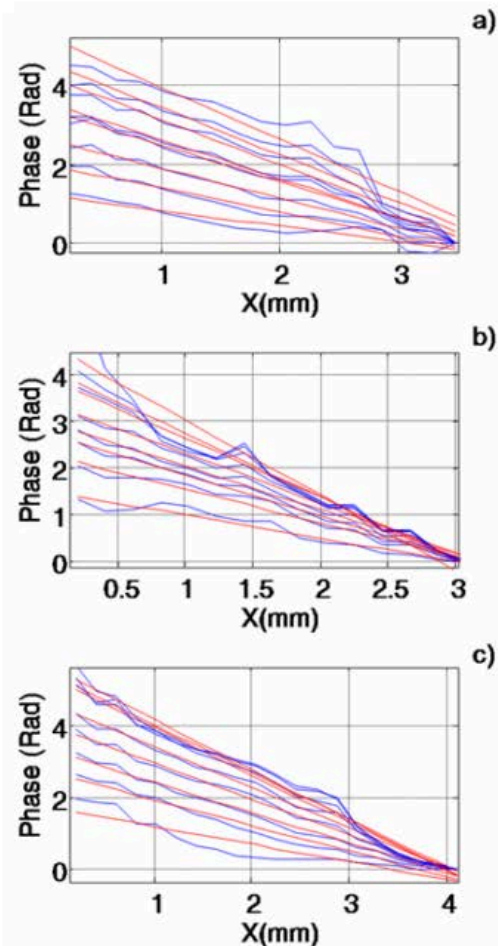


Fig. 12. Phase changes of each frequency component (ranging from 200 Hz to 2900 Hz) of the mechanical wave versus propagation distance for the three "pushing" modes at different push location (a)  $x = 5$  mm, b)  $x = 10$  mm, c)  $x = 15$  mm). The linear fit deduced for each frequency component enables the assessment of the wave speed and consequently the recovery of the shear wave dispersion curve.

#### E. Elasticity changes induced by photodynamic Riboflavin/UV-A corneal cross-linking

Several fresh porcine eyes were treated using photodynamic Riboflavin/UV-A collagen induced CXL. SSI sequences were

performed before and after the UV-A Laser exposure. Figure 14 shows the time profiles of tissue displacement at each location along a curvilinear line corresponding to a constant depth inside cornea. The mechanical wave speed strongly increases after UV-A exposure clearly exhibiting a strong increase in the cornea stiffness. The shear wave spectroscopy algorithm enables to recover respective 190 kPa  $\pm$  32 kPa and 890 kPa  $\pm$  250 kPa values for cornea Young's before and after collagen induced crosslinking (corresponding for a 1.2 mm thickness, respectively to  $c = 5.1$  m/s and 8.5 m/s shear wave phase speeds at a 1500 Hz central frequency). This 460% increase ratio is in agreement with recent values provided by Wollensak et al [45] and Kohlhaas et al [46].

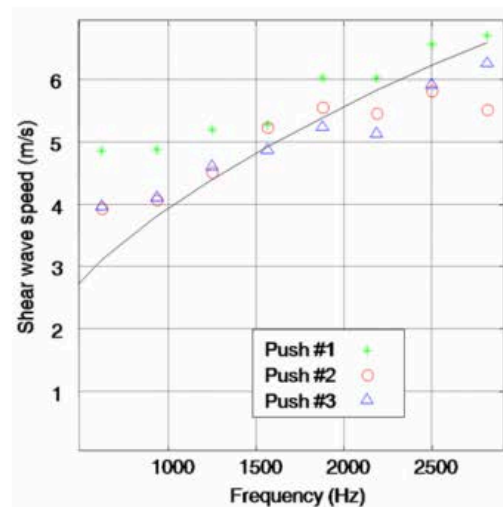


Fig. 13. Shear wave dispersion curves estimated experimentally for the three successive mechanical waves generated by pushing modes n°1, 2 and 3 into the porcine cornea. The solid line corresponds to eq. 2, with a chosen  $c_s = 7.9$  m/s (i.e. cornea Young's Modulus  $E \sim 190$  kPa).

Finally, 2D mapping of cornea stiffness were performed and are presented in figure 15. The strong increase in local shear wave speed (and by correlation Young's modulus) is clearly demonstrated analyzing the slope of the time profiles.

#### F. High resolution Imaging of corneal elasticity

Finally, the high resolution capabilities for corneal stiffness mapping provided by the SSI imaging mode are demonstrated in figure 16. This 2D mapping of shear wave speed corresponds to experimental data acquired on one single case of a porcine eye whose cornea had been probably partially burnt (coagulation) before the animal sacrifice (an opaque scar was observed onto the corneal opening eyelid area). One clearly distinguishes in figure 16 the appearance of a very stiff layer in the cornea (200  $\mu$ m thick). Such layered structure was also confirmed on the movie of the local tissue displacement. The propagation of the mechanical wave is clearly much faster

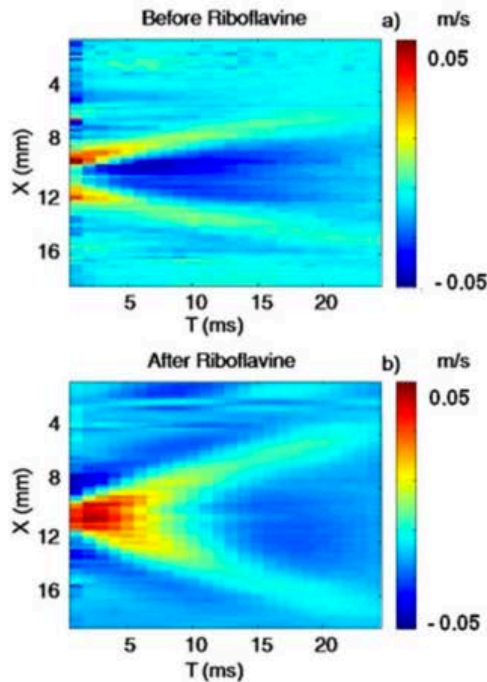


Fig. 14. Time profiles of tissue particle velocity (i.e. relative displacement of tissues between to successive ultrasonic images) at each location along a curvilinear line. This ligne corresponds to a constant depth inside cornea (a) before and (b) after UV-A exposure. Colors scale is ranging between  $-0.05$  m/s and  $+0.05$  m/s.

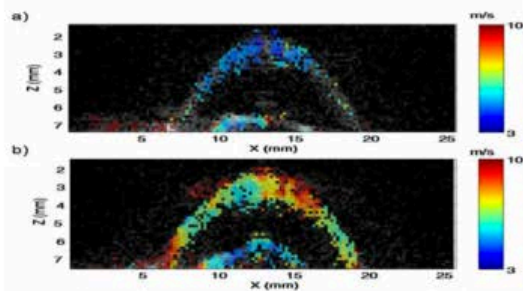


Fig. 15 Influence of CXL on corneal stiffness: 2D mapping of the local shear wave speed (a) before and (b) after Riboflavine and UV-A exposure.

in the upper first layer of the cornea than in deeper cornea tissues. The capability of the SSI mode to provide local information in different layers inside the cornea is here shown to be feasible experimentally with a typical  $150\ \mu\text{m}$  resolution.

#### IV. DISCUSSION

The main purpose of this preliminary clinical study was to evaluate the capability of the SSI mode to provide quantitative elasticity maps of different cornea and to determine the clinical situations where this technique could add potential value to US examinations. Contrary to other investigated

applications such as breast cancer diagnosis [2], liver fibrosis staging [16] or muscle properties assessment [17], the transposition to corneal stiffness imaging required to strongly improve spatial resolution of the technique.

For this application, the ultrasonic probe frequency (15 MHz) was strongly increased compared to imaging probes used for deep organs such as breast, liver or heart (respectively 8 MHz, 4 MHz and 2.5 MHz) and leads to two important remarks: First, the resolution of the echographic images is very high ( $150\ \mu\text{m}$ ) and the ultrasonic focal spot inducing the radiation force in the cornea has a very high lateral resolution (around  $100\ \mu\text{m}$ ). As the frequency spectrum of the mechanical wave is directly linked to the focal spot size, the mechanical wave induced by the “pushing beam” is characterized by a very high frequency spectrum (typically from 500 Hz to 3000 Hz). This enables the sounding of mechanical properties of cornea with shear waves of small wavelengths, thus enhancing the resolution of the final Young’s modulus mapping. Moreover, as the echographic imaging depth is reduced (20 mm) in comparison with deep seated organs, ultrafast frame rates as high as 20,000 Hz can be reached. It enables a very high temporal resolution for the estimates of the transient tissue displacement time profiles even if the induced shear wave possesses very high frequency components (up to 3000 Hz). Finally, displacements induced by the radiation force are very small (of the order of tens of  $\mu\text{m}$ ) and a nonlinear biomechanical response of cornea can be rejected on the contrary of other existing approaches such as ORA (ocular response analyzer).

In all investigated porcine eyes, the ultrasonic probe was able both to generate a remote mechanical vibration in the cornea and to track the transient propagation of the resulting shear wave inside cornea.

Porcine eye corneal stiffness was found to be rather homogeneous with a mean 190 kPa value and to strongly increase (460 % increase) after riboflavin collagen induced crosslinking. Riboflavin/UVA cross-linking seems to affect the cornea elasticity non-uniformly as seen in figure 15. This non uniformity does not correspond to artifacts. Indeed, the areas of higher stiffness visible in figure 15 correspond to regions of higher shear wave speed. However, although such a non-uniform spatial distribution of cross-linking stiffening seems to be accepted by clinicians, there is to our knowledge no evidence regarding this point in the literature.

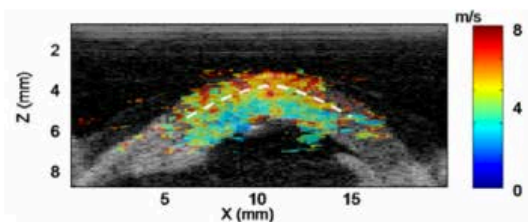


Fig. 16. 2D mapping of shear wave speed of an excised porcine eye whose cornea had been partially burned. The SSI modality is clearly able to image a very stiff  $500\ \mu\text{m}$  first layer in the cornea.



Thanks to the resolution of the echographic image, the resolution obtained in the elasticity image is quite high and permits to estimate local elasticity in different layers of the cornea (see fig. 16).

Finally, the applicability for clinical investigations can be easily envisioned as the method is insensitive to motion artifacts. Moreover contrary to the only system used today in clinical practice, the O.R.A. system [47], the SSI modality gives access to the real physical parameter (mechanical property parameter), i.e. the Young's modulus, as it is based on the direct visualization and estimation of mechanical wave propagation. By estimating only two applanation pressures times at the single location of the air pulse on the cornea, the ORA cannot resolve the inverse problem of this shear wave propagation and recover direct estimates of physical biomechanical parameters such as corneal elasticity or viscosity. Consequently, it provides a cornea hysteresis parameter that cannot be linked easily to stiffness. The same kind of limitation can be encountered for elasticity imaging in deep organs using the ultrasonic radiation force: it is extremely difficult to estimate the Young's modulus only from the knowledge of tissue displacement only at the location of the applied force (see eq. 22 in reference [Sarvazyan et al 1998]). Instead of imaging tissues displacement only at the force location, a 2D mapping of tissue displacements allows recovering shear wave propagation parameters such as wave speed and consequently Young's modulus. Finally, contrary to transient displacements induced by ORA, tissue motion induced using the SSI modality corresponds to very small micrometric displacements (small perturbations) with typical millimetric wavelengths (transient pulsed perturbation with typical 1500 Hz frequency). For that reason, it should be less influenced than ORA by boundary conditions such as tissue tension or intra-ocular pressure.

The clinical applicability of the SSI modality for the estimation of cornea elasticity requires ensuring that the acoustic power required for generating the radiation force remains below the FDA limits. This is possible as typical 10  $\mu\text{m}$  local displacements can be generated without overtaking these limitations. Such displacements can be detected using ultrafast ultrasonic sequences that can track tissue displacement as small as 1  $\mu\text{m}$ . Regarding practical *in vivo* applicability, a coupling liquid could easily be inserted in a cup between the eye and the ultrasonic probe. The complete elasticity investigation will not modify at all a conventional ultrasonic procedure in ophthalmology and will provide the biomechanical properties of cornea in addition to the ultrasonic images. Moreover, a detailed signal processing analysis of shear wave propagation enables accessing *in vivo* the complete mechanical behavior of the cornea on a very large bandwidth. Such dynamic mechanical spectroscopy of the cornea was up today only achievable using explanted human corneas [48] in the 0.1 -100 Hz range. The SSI modality permits to achieve the shear wave spectroscopy [34] non invasively and in real time.

For *in vivo* applications, the coupling liquid between the

echographic probe and the cornea should probably not influence the cornea stiffness estimates. Indeed, it is well known that hydration by short corneal immersion induces very small changes *in vivo* in corneal thickness and shear compliance at least in the 0.1 mHz to 100 Hz [48]. Although shear wave spectroscopy provided by the SSI modality corresponds to a much higher frequency bandwidth, it seems that these results could be reasonably extrapolated to our mechanical frequency bandwidth. Such assumption will be carefully studied in further *in vivo* works. For *ex vivo* studies where hydration is known to play a role by increasing cornea thickness, it should be carefully studied whether only thickness is affected by hydration or both thickness and Young's modulus are changing. This is a non trivial problem, as corneal thickness affects the mechanical wave speed. However, the quantitative method proposed in this paper should be able to discriminate the influence of hydration on both parameters.

In terms of resolution, very high resolution maps were obtained in this study, as the elasticity mapping is only limited by the resolution of the echographic images. Thus, increasing the ultrasonic probe frequency up to 25 MHz could even lead to a 70  $\mu\text{m}$  resolution of the cornea elasticity map provided by the SSI modality.

In this study, shear viscosity of cornea tissue was neglected. Such viscosity definitely also affects the dispersion curves of the mechanical guided wave in the cornea. The discrimination between the distinct influences of both the guided mode propagation and the shear viscous term onto the dispersion of the wave propagation should be studied in further works.

Finally, in this study, corneal tissues were assumed to be isotropic. This assumption is not totally valid. Indeed, the human cornea has the macroscopic structure of a thin shell, originated by the organization of collagen lamellae parallel to the middle surface of the shell. The lamellae, composed of bundles of collagen fibrils, are responsible for an experimentally observed anisotropy of the cornea. Smolek has shown that the mean interlamellar cohesive strength is diminished in the inferior peripheral portion of the cornea compared to values obtained from the other principal meridians [49]. The mean cohesive strength in the central cornea was shown to be less than that of the superior periphery. However, Smolek concluded that the biomechanical significance of this deficit is probably minor if not irrelevant in the average, intact cornea under physiologically normal tensile loading, but may become significant in corneas with specific forms of degenerative disease or trauma that induces shearing strains between the lamellar sheets of the stroma.

Further work will concentrate on the influence of cornea elastic anisotropy on the shear wave propagation. The ability of the ultrasonic radiation force to polarize the generated shear waves in different orientations could help us to quantify at least an eventual radial anisotropy of cornea elasticity.

## V. CONCLUSION

This initial investigation demonstrates the ability of ultrafast and high resolution echographic systems to provide a real-time and quantitative mapping of corneal elasticity. Quantitative elasticity maps were acquired *ex vivo* on porcine cornea using the SSI technique. Quantitative maps of corneal elasticity were obtained in all fresh porcine eyes. A 190 kPa  $\pm$  32 kPa mean elasticity was obtained for four different specimens. The SSI modality was found able to quantify the influence of photodynamic Riboflavin/UV-A induced CXL on corneal stiffness. A significant Young's modulus increase was obtained with a mean 890 kPa  $\pm$  250 kPa post-treatment Young's modulus ( $\sim$ 460% increase). Simulations based on 3D time domain finite differences simulation were also performed and found to be in good agreement with *in vitro* experiments. The Supersonic Shear imaging technique can perform real-time, very high resolution and quantitative maps of corneal elasticity. This technique can be real time and straightforward adapted for *in vivo* investigations. Further works will study the influence of Intra Ocular Pressure on corneal elasticity and present first clinical investigations of the SSI modality in ophthalmology.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Yurii Zaitsev for technical assistance.

## REFERENCES

- [1] Garra B. S., Cespedes L., Ophir J., Pratt S., Zaubier R., Magnat C. M., Pennanen M. F. Elastography of breast lesions: initial clinical results, *Breast Imaging. Radiology* 2002, 202:79-86.
- [2] Tanter M., Bercoff J., Athanasiou A., Deffieux T., Gennisson JL, Montaldo G., Muller M., Tardivon A., Fink M. Quantitative assessment of breast lesion viscoelasticity: Initial clinical results using supersonic shear imaging; *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34(9), 1373-1386, Sep. 2008.
- [3] Sandrin L., Fourquet B., Hasquenoph JM, Yon S., Fournier C., Mal F., Christidis C., Ziol M., Poulet B., Kazemi F., Beaugrand M., Palau R. Transient elastography : a new non-invasive method for assessment of hepatic fibrosis, *Ultrasound Med Biol* 2003; 29:1705-1713.
- [4] Ziol M., Handra-Luca A., Kettaneh A., Christidis C., Mal F., Kazemi F., de Lédinghen V., Marcellin P., Dhumeaux D., Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005; 41:48-54.
- [5] Friedrich-Rust M, Ong MF, Herrman E, Dries V, Samaras P, Zeuzem S, Sarrazin C. Real-time elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis, *AJR* 2007; 188:758-764
- [6] De Korte CL., Pasterkamp G, van der Steen AFW, Woutman H.A. , Bom N. , "Characterization of plaque components with intravascular ultrasound elastography in human femoral and coronary arteries *in vitro*", *Circulation*, 102(6), pp 617-623, Aug 2000.
- [7] De Korte CL, van der Steen AFW, Cespedes EI, Pasterkamp P., Intravascular ultrasound elastography in human arteries: Initial experience *in vitro*, *Ultr. Med. Biol.*, 24(3), pp 401-408, Mar. 1998.
- [8] Kowalski M, Kulski T, Jamal F, D'Hooge J, Weidemann F, Rademakers F, Bijns B, Hatle L, Sutherland GR, "Can natural strain and strain rate quantify regional myocardial deformation? A study in healthy subjects", *Ultr. Med. Biol.*, 27(8), pp 1087-1097, Aug. 2001.
- [9] Konofagou E.E., D'Hooge J., Ophir J., Myocardial elastography - A feasibility study *in vivo*, *Ultra. Med. Bio.* 2002, 28(4):475-482.
- [10] Bercoff J, Pernot M, Tanter M, Fink M. Monitoring thermally-induced lesions with supersonic shear imaging. *Ultrasonic Imaging*, 26(2), 71-84, Apr 2004.
- [11] Tanter M., Bercoff J., Sandrin L., Fink M. Ultrafast compound imaging for 2D motion vector estimation : Application to transient elastography. *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelec., Freq. Contr.* 2002, 49(10): 1363-1374.
- [12] Bercoff J. , Chaffai S., Tanter M., Sandrin L., Catheline S., Fink M., Gennisson J.-L., Meunier M. In Vivo breast tumors detection using transient elastography. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2003, 29(10):1387-1296.
- [13] Bercoff J., Tanter M., Fink M. Sonic boom in soft materials : the elastic Cerenkov effect. *Appl. Phys. Lett.* 2004, 84(12):2202-2204.
- [14] Bercoff J., Tanter M., Fink M. Supersonic shear imaging : a new technique for soft tissues elasticity mapping. *IEEE Trans. Ultra., Ferro. Freq. Ctrl.* 2004, 51(4):396-409.
- [15] Sarvazyan A. P., Rudenko O. V., Swanson S. D., Fowlkes J. B., Emelianov S. Y., "Shear wave elasticity imaging - a new ultrasonic technology of medical diagnostic. *Ultra. Med. Bio.* 1998, 20:1419-1436.
- [16] Muller M., Gennisson J.-L., Deffieux T., Tanter M., Fink M. Quantitative mapping of human liver using Supersonic Shear Imaging : Preliminary *in vivo* feasibility study, *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 35, No. 2, pp. 219-229, 2009.
- [17] Deffieux T., Gennisson JL, Tanter M, Fink M. Assessment of the mechanical properties of the musculoskeletal system using 2-D and 3-D very high frame rate ultrasound *IEEE Trans. On Ultr. Ferr. And Frq. Ctrl.*, 55(10), 2177-2190 , Oct. 2008.
- [18] K.W. Hollman, S. Y. Emelianov, J. H. Neiss, G. Joty, G. J.R. Spooner, T. Juhasz, R. M. Kurtz and M. O'Donnell. "Strain Imaging of Corneal Tissue with an Ultrasound Elasticity Microscope", *Cornea* 21(1): 68-73, 2002.
- [19] Juhasz T, Frieder H, Kurtz RM, et al. Corneal refractive surgery with femtosecond lasers. *IEEE J Sel Top Quant.*, 5:902-10, 1999.
- [20] Juhasz T, Djoty G, Loesel FH, et al. Applications of femtosecond lasers in corneal surgery, *Laser Phys.*, 10, 495-500, 2000.
- [21] Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res.*, 29(1), 35-40, Jul. 2004.
- [22] Comaish IF, Lawless MA. Progressive post-LASIK keratectasia: biomechanical instability or chronic disease process? *J Cataract Refract. Surg.* 2002;28:2206-2213.
- [23] Dupps W.J. Jr. Biomechanical modeling of corneal ectasia. *J. Refract. Surg.*, 21, pp 186-190, 2005.
- [24] Friedenwald JS. Contribution to the theory and practice of tonometry. *Am J Ophthalmol.*, 20, pp 985-1024, 1937.
- [25] Liu J, Roberts CJ. Influence of corneal biomechanical properties on intraocular pressure measurement: quantitative analysis. *J Cataract Refract. Surg.*, 31, pp 146-155, 2005.
- [26] Nordan LT. "Keratoconus: diagnosis and treatment." *Int Ophthalmol Clin.*, 37(1):51-63, 1997.
- [27] Binder PS. Analysis of ectasia after laser *in situ* keratomileusis: risk factors. *J Cataract Refract Surg.* 2007 Sep;33(9):1530-8.
- [28] Elsheikh A, Wang D, Pye D. Determination of the modulus of elasticity of the human cornea, *J Refract Surg.*, 23(8):808-18, Oct 2007.
- [29] Ophir J., Cespedes L., Ponnekanti H., Yasdi Y., Li X. Elastography: A Quantitative Method for Imaging the Elasticity of Biological Tissues. *Ultrasonic Imaging* 1991, 13:111-134.
- [30] Dupps W.J. Jr, Netto M., Herekar S., and Krueger R. R. Surface Wave Elastometry of the Cornea in Porcine and Human Donor Eyes. *J Refract Surg.* 2007 January; 23(1): 66-75.
- [31] Orsengo G., Pye D. Determination of the True Intraocular Pressure and modulus of Elasticity of the Human Cornea *in vivo*. *Bulletin of Mathematical Biology* (1999) 61, 551-572.
- [32] Bercoff J, Tanter M, Muller M, Fink M. The role of viscosity in the impulse diffraction field of elastic waves induced by the acoustic radiation force. *IEEE Trans. on Ultr. Ferr. And Frq. Ctrl.*, 51(11) , 1523-1536, Nov 2004.
- [33] Food and Drug Administration. Information for Manufacturers seeking marketing clearance of diagnostic ultrasound system and transducers. Available at: [www.fda.gov/cdrh/ode/ulstran.pdf](http://www.fda.gov/cdrh/ode/ulstran.pdf), 1997.
- [34] Deffieux T., Montaldo G., Tanter M., Fink M., Shear Wave Spectroscopy for Quantification of Human Soft Tissues Visco-Elasticity, *in press*, *IEEE Trans. On Medical Imaging*, 2009.
- [35] Virieux J. P-SV wave propagation in heterogeneous media: Velocity-stress finite-difference method. *Geophysics*, 51(4), pp. 889-901, Apr. 1986.

- [36] Berenger J. P. , "A perfectly matched layer for the absorption of electromagnetic waves", J. Comp. Phys., vol. 114, pp. 185-200, Oct. 1994.
- [37] Wang H, Prendiville PL, McDonnell PJ, Chang WV. An ultrasonic technique for the measurement of the elastic moduli of human cornea. *Nature* **284**, 489-491, April 1980.
- [38] Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg.*, 29(9):1780-5, Sep. 2003.
- [39] Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results. *J Refract Surg.* 2008 Sep;24(7):S720-5.
- [40] Kymionis G, Portaliou D. Corneal crosslinking with riboflavin and UVA for the treatment of keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2006 May;32(5):837-45.
- [41] Lamb, H. On Waves in an Elastic Plate. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A* 93, 114-128, 1917.
- [42] Krauklis P.V, Molotkov L.A. "Low-frequency Lamb waves in cylindrical and spherical layers in an elastic medium," *Journal of Mathematical Sciences*, vol. 3, Jan. 1975, pp. 82-90.
- [43] Royer D and Dieulesaint E., *Elastic waves in solid*, Ed. Springer Verlag, vol. 1, (1996).
- [44] Pernot M., Couade M., Prada C., Messas E. , Tanter M., Fink M. Dispersion of elastic waves in soft cylindrical shells: application to quantitative imaging of arterial wall elasticity, in review, *Applied Physics Letters*.
- [45] Wollensak G, Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera. *J Cataract Refract Surg.* 2004 Mar;30(3):689-95.
- [46] Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Wittig C, Pillunat LE. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg.* ;32(2):279-83, Feb. 2006.
- [47] Shah S, Laiquzzaman M, Bhojwani R, Mantry S, Cunliffe I. Assessment of the biomechanical properties of the cornea with the ocular response analyzer in normal and keratoconic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 48(7):3026-31, July 2007.
- [48] Soergel F, Jean B, Seiler T, Bende T, Mücke S, Pechhold W, Pels L. Dynamic mechanical spectroscopy of the cornea for measurement of its viscoelastic properties in vitro. *Ger J Ophthalmol.*, 4(3):151-6, May 1995.
- [49] Smolek M. "Interlamellar Cohesive Strength in the Vertical Meridian of Human Eye Bank Corneas". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, September 1993, Vol. 34, No. 10.

# POSTERS reliés à la thèse

## Elastographie Transitoire Cornéenne

### Evaluation Expérimentale

D Touboul<sup>1,3</sup>; TM Nguyen<sup>1</sup>; M Tanter<sup>1</sup>; JL Gennisson<sup>1</sup>; JF Aubry<sup>1</sup>; N Grenier<sup>2</sup>; C Moonen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR 7587, ESPCI, Institut Langevin, Ondes et Images, Paris  
<sup>2</sup>CNRS UMR 5231, Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle: de la Physiologie à la Thérapie  
<sup>3</sup>Centre National de Référence du Kératocorne (CRNK), Service d'ophtalmologie, CHU de Bordeaux

#### Introduction

La mesure de la biomécanique transitoire (BMC) n'est pas possible actuellement en clinique. Pourtant la mesure de la pression intra-oculaire (PIO) est essentielle pour le diagnostic du glaucome. La mesure de la PIO est essentielle pour le diagnostic du glaucome. La mesure de la PIO est essentielle pour le diagnostic du glaucome.

#### Méthodes d'Analyses de la BMC

- Palpation Manuelle, intuitive, peu résolutive
- Imagerie Ultra Structurale (Modélisation)
  - Statique
- Imagerie de Déformation (Elastographie-1980)
  - Extension mécanique (crochets)
  - Exsufflation (perfusion = invasif)
  - Indentation mécanique (compression axiale)

#### Contraintes de l'Elastographie

- Déformer un corps modifie l'équilibre biomécanique de ce dernier
- L'amplitude doit être faible
  - Imagerie Quasi Statique
  - Analyse des variations de Formes ou de Volumes
  - Echelles Relatives
- L'amplitude négligeable → Ondes Mécaniques
  - Elastographie Dynamique
  - Echelles Absolues

#### 2 types d'Ondes Mécaniques sont Accessibles pour Sonder les Tissus

- Ondes de Compression : Viscosité des Fluides
  - Rapides : 1500 m/s dans H2O / MHz
  - Amplées (GPa), Peu atténuées
  - Imagerie Echo/Doppler US
- Ondes de Cisaillement (Cs) : Élasticité des Solides
  - Lentes : 10-200 m/s dans tissus, nulle dans H2O
  - Peu amplées (k à MPa), Rapidement atténuées

#### Intérêts des Ondes de Cisaillement Cs

- Voir des variations locales de la dureté des tissus
- Base de l'Elastographie Dynamique
- Corrélation simple entre vitesse de l'Onde  $v$  et  $E$ 

$$E = 3 \rho v^2$$

#### CORRELATION

Module de Young  $E$  / Vitesse onde Cs  $v$

Module de Compressibilité  $K$

Module de Cisaillement  $\mu$

$E = 3 \mu$

$v \rightarrow \mu \rightarrow E$

#### Générer des Ondes de Cisaillement

- Onde de Compression US
- Difficultés
  - Interface (in vivo)
  - Focalisation
  - Atténuation (viscosité)
  - Rebonds aux limites (bords)
  - Acquisition de l'information  $v$

#### Imagerie des ondes de Cs intra tissulaires = Supersonic Shear Wave Imaging (SSI)

- Génération d'un front d'Ondes Cs par une radiation focalisée d'ondes de Compression US
  - Non contact
  - Générant une Onde Cs Transversale Homogène
- Acquisition Echographique de son déplacement
  - Grand champ (> cornée)
  - Ultras rapide (> 20 kHz)
  - Transitoire (< 20 ms)
- Convolution mathématique robuste: cartographies

#### Méthode

Notre première approche expérimentale a permis d'évaluer la variation de dureté de la cornée en fonction de la pression intra-oculaire. La mesure de la dureté de la cornée est essentielle pour le diagnostic du glaucome. La mesure de la dureté de la cornée est essentielle pour le diagnostic du glaucome.

#### Génération d'un front d'Ondes Cs

Poussée par Pression de Radiation - Mode Supersonique

- Poussée US
- Focalisée
- Supersonique
- Multizones

#### Acquisition Echographique Ultrarapide

Un savoir faire très spécifique !

#### Technologie SSI

Convolution Cartographique

#### Résultats

La mesure de la dureté cornéenne et de la pression intra-oculaire a permis de valider la mesure de la dureté cornéenne. La mesure de la dureté cornéenne est essentielle pour le diagnostic du glaucome. La mesure de la dureté cornéenne est essentielle pour le diagnostic du glaucome.

#### Expérimentations

Relation entre Module de Young (dureté) et PIO

#### L'augmentation de la Pression d'Inflation est Positivement Corréliée avec la Vitesse des Ondes Cs

#### Conversion des Vitesse en Dureté

$E$  devient une fonction Quadratique de la PIO

#### Preuves du concept : CXL ex vivo

#### Cartes Elastographiques

Durcissement +++ après CXL Ex vivo

Cornées porcines

#### CXL sur yeux porcins IN VIVO

Vitesse Moyenne des Ondes de Cisaillement

Oeil après CXL

Oeil avant CXL

#### Tests d'Anisotropie

Yeux porcins IN VIVO

#### Tests d'Anisotropie

Yeux porcins IN VIVO post CXL Différentiel

#### CXL Décentré IN VIVO

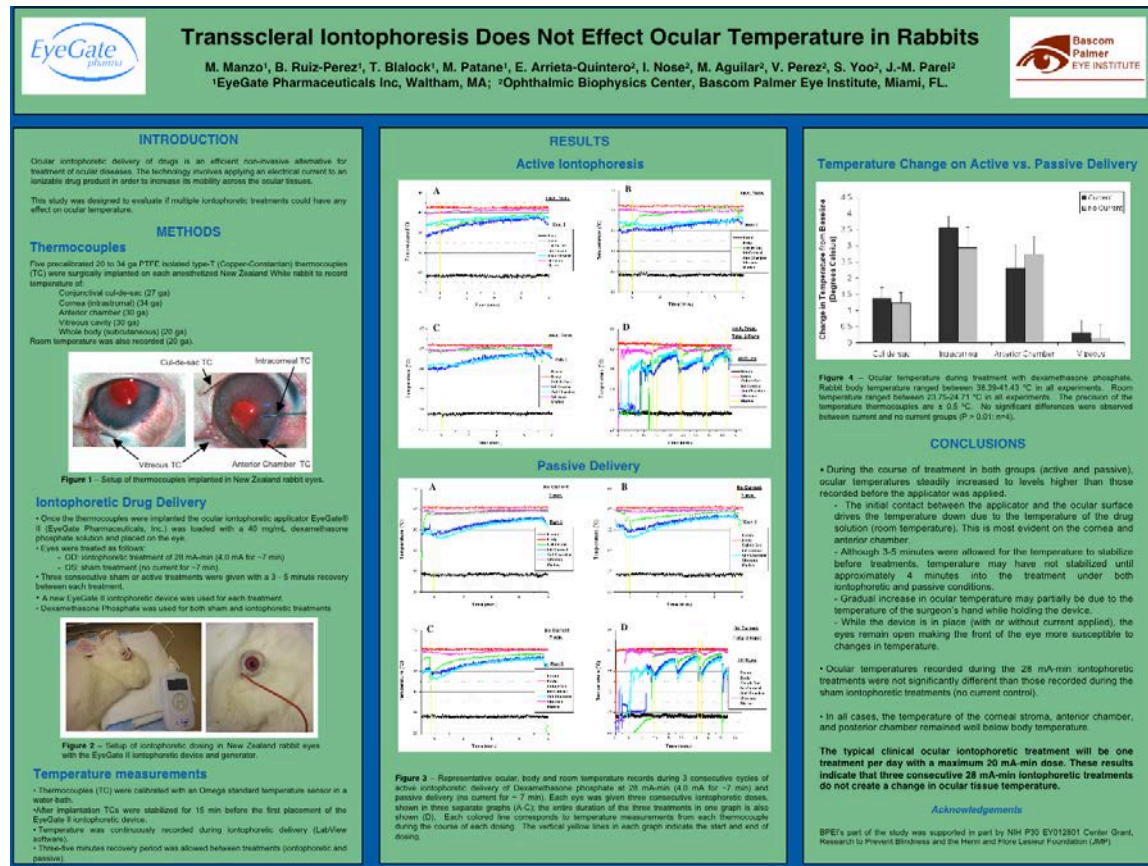
Sélectivité spatiale confirmée

#### Conclusions

Notre première approche expérimentale sur le transfert de la technologie d'élastographie transitoire aux applications ophtalmologiques a permis de valider la pertinence des mesures pour les applications cliniques. La prochaine étape est la construction d'une interface utilisateur conviviale et adaptée aux essais cliniques chez l'homme. L'acquisition d'images échographiques par ce système, sur modèle animal, permettrait d'apporter de nouvelles informations utiles aux cliniciens. L'élastographie transitoire représente un espoir important de progrès dans le diagnostic des anomalies cornéennes congénitales ou acquises et la mesure de la pression intra-oculaire réelle.

#### Bibliographie





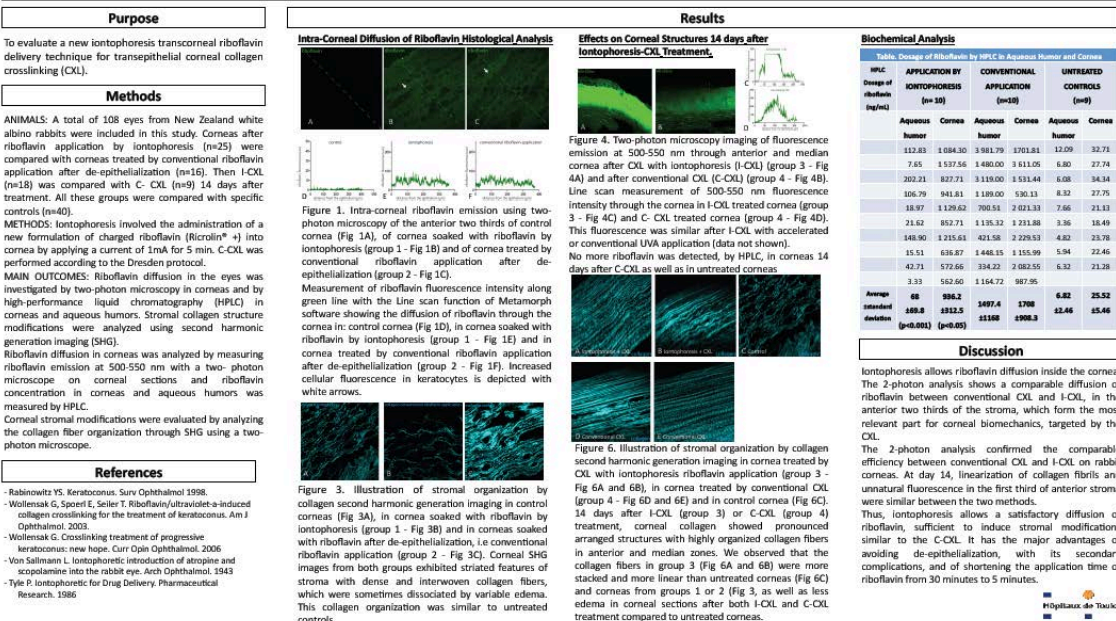
## Iontophoresis transcorneal delivery technique for transepithelial corneal collagen crosslinking with riboflavin in a rabbit model.

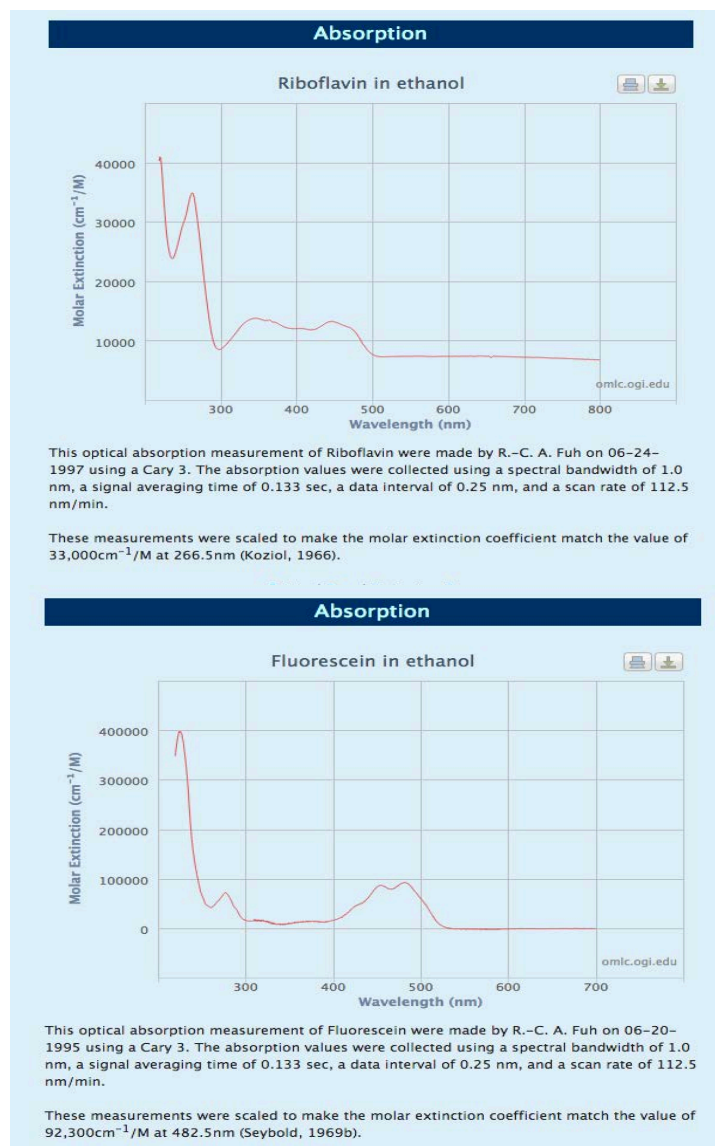
Posterboard C0037 – Presentation 4299

Soler, Vincent J.<sup>1,2</sup>; Cassagne, Myriam<sup>1,2</sup>; Laurent, Camille<sup>3</sup>; Galinier, Anne<sup>4</sup>; Fournie, Pierre R.<sup>1,2</sup>; Rodrigues, Magda<sup>2,5</sup>; Galiacy, Stéphane<sup>1</sup>; Roy, Pierre<sup>6</sup>; Malecaze, Francois J.<sup>1,2</sup>

UMRS 563, CPTP, Université Paul Sabatier, Toulouse, France<sup>1</sup>; Ophthalmology, Toulouse Purpan Hospital, Toulouse, France<sup>2</sup>; Laboratory of Pathology, Toulouse Purpan Hospital, Toulouse, France<sup>3</sup>; Department of Biochemistry, Toulouse Rangueil Hospital, Toulouse, France<sup>4</sup>; INSERM U1043, Center of Physiopathology, « Dynamique Moléculaire des Interactions Lymphocytaires » unit, Toulouse, France<sup>5</sup>; Hexamed, Paris, France<sup>6</sup>.

Corresponding author: Vincent J. Soler. email address: vancesoler@yahoo.fr





Koziol J. Studies on flavins in organic solvents. Spectral characteristics of riboflavin, riboflavin tetrabutryate and lumichrome. Photochem. Photobiol. 1966. 5: 41-54.

Seybold PG, Gouterman M, Callis J. Calorimetric, photometric and lifetime determinations of fluorescence yields of fluorescein dyes. Photochem Photobiol. 1969. 9; 3: 229-242.



COMPTE RENDU D'ANATOMOPATHOLOGIE et RAPPORT D'INNOCUITE



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE BORDEAUX

SERVICE DE PATHOLOGIE

Chef de service : Professeur Anne VITAL

Site Groupe Hospitalier PELLEGRIN

Bordeaux, le 31 janvier 2014

Professeurs des Universités  
Praticiens Hospitaliers

Pr Anne Vital  
P 15003  
N°RPPS : 10002810496

Pr Bertrand Bloch  
p 15050  
N°RPPS : 10002764669

Pr Brigitte Le Bail  
p 15082  
N°RPPS : 10004926399

Maîtres de Conférences  
Praticiens Hospitaliers

Dr Dominique Carles  
p 0556799823  
N°RPPS : 10902749928

Dr M. L. Négrier-Leibreich  
p 0556795607  
N°RPPS : 10002812195

Dr Sandrine Eimer  
p 15008  
N°RPPS : 10002813383

Dr Sébastien Lepreux  
p 15162  
N°RPPS : 10002813458

Dr Fanny Pelluard  
p 15009  
N°RPPS : 10902822789

Maître de Conférences  
Praticien Attaché

Dr François Léger  
p 15030  
N°RPPS : 10002826229

Praticiens Hospitaliers

Dr Gwenaëlle André  
p 15009  
N°RPPS : 10004607791

Dr Anne Rollier  
p 16658  
N°RPPS : 10002828670

Dr Mokrane Yacoub  
p 15023  
N°RPPS : 10100030104

Assistante-Hospitalo-  
Universitaire

Dr Claire Castain  
p 15050  
N°RPPS : 10100272201

Attachée  
Pr Paulette Bioulac-Sage  
p 15002  
N°RPPS : 10002747581

Internes - p 15004

Cadre Médico-Technique  
M<sup>lle</sup> Vincent Coianiz  
p 15000

**Analyse histologique d'innocuité pour notre protocole de recherche  
Microelasto portant sur 20 globes oculaires de 10 lapins (D.  
Touboul, PH d'Ophthalmologie, CHU de Bordeaux).**

**But**

Le test d'innocuité porte sur l'analyse histologique (cornée, cristallin, rétine) de 20 globes oculaires de 10 lapins. Le protocole de recherche Microelasto appliqué à un seul œil d'un même lapin n'est pas connu du pathologiste.

**Matériel & Méthode**

Analyse histologique comparative de 20 globes oculaires provenant de 10 lapins identifiés par un numéro alpha numérique : numéro identique pour la même paire suivi de OD (œil droit) ou de OG (œil gauche)

Chaque globe oculaire fixé 48 heures dans le formol tamponné a fait l'objet de 2 prélèvements :

\*une coupe sagittale médiane perpendiculaire à une ligne matérialisée par les 2 points marqués par l'opérateur au niveau de la conjonctive limbique par feutre noir diamétralement opposés passant par l'axe optique et permettant d'étudier la cornée et la rétine

\*une coupe équatoriale du cristallin

Chaque prélèvement inclus en paraffine a fait l'objet d'une coupe de 3 µm suivie d'une coloration standard hématoxyline éosine safran (HES)

Microphotographies grossissement x10, x20, x40 réalisées sur les 20 cas à analyser : cornées, cristallin et rétine.

Mesures particulières effectuées : épaisseur de la cornée de chaque cas et nombre de mitose présente au niveau de l'épithélium cornéen d'une extrémité limbique à l'autre.

**Résultats :**

- 1- **Cornées :** pour les 20 cornées examinées, l'épaisseur moyenne de l'épithélium mesurée dans la partie centrale de la cornée s'établit à 621,5 µm avec un écart type de 63 et des extrêmes [550-750 µm], de même le nombre d'assises cellulaires le plus faible rencontré au niveau de l'épithélium variant de 3 à 4 ne permettent pas de trouver une différence significative lorsqu'on compare à l'aveugle les 2 cornées d'un même propositus.

.../...

GRUPE HOSPITALIER PELLEGRIN – ENFANTS

Place Amélie Raba Léon – 33076 Bordeaux Cédex

Identification : 33 0 781360

Secrétariat : ☎ 05 56 79 55 89/05.56.79.59.04. (lignes directes) - Fax : 05 56 79 60 88.  
Accueil – Réception des prélèvements : 15001

Le stroma lamellaire ne présente pas d'anomalies particulières à savoir : inflammation, néo-vascularisation, apoptose des kératocytes.

L'endothélium est le plus souvent vésiculeux, parfois décollé mais cela doit rentrer dans le cadre des artefacts techniques.

L'activité mitotique au niveau de la basale épithéliale s'établit en moyenne à 2,7 images de mitose avec un écart type de 1,5 et des extrêmes [0-6]. L'activité mitotique pourrait être le seul critère subjectif qui permettrait de distinguer l'œil qui a bénéficié du procédé Microelasto. Dans 5 paires, la différence du nombre de mitose est de 2 (seuil significatif) alors que dans les 5 autres paires la différence n'est que d'une seule mitose.

**2- Cristallin :** il s'agit d'un tissu assez dur et les coupes histologiques sont le plus souvent difficiles à réaliser. Seul, le cristallin 323572 OG disloqué n'est pas interprétable.

L'examen comparatif a porté sur la zone équatoriale. Une micro-vésiculation plus ou moins marquée des fibres cristalliniennes est souvent retrouvée mais là encore sur les 2 cristallins du même propositus. Il n'y pas d'inflammation, ni rupture capsulaire.

**3- Rétine/ choroïde :** la rétine examinée comparativement au voisinage du nerf optique ne montre pas de différences histologiques majeures. Il est également très difficile de parler d'hypoplasie ou d'hyperplasie de l'une des couches rétinienne. Aucun cas n'a montré une image de rétinite. Au niveau choroïdien, on remarque une certaine congestion sans que ce soit un critère discriminant. Un seul cas, 323507 OD, montre la présence focale de polynucléaires éosinophiles choroïdiens.

#### Conclusion :

L'analyse histologique standard (cornée, cristallin et rétine) sur 20 globes oculaires de lapins ne montre pas de différences morphologiques entre les 2 globes oculaires d'un même lapin. L'hypothèse qu'une activité mitotique plus importante du côté traité permettrait de désigner l'œil qui a bénéficié de la technique MICROELASTO mais vérifiée subjectivement que dans 5 paires sur 10.

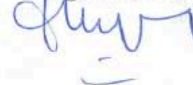
Une activité mitotique plus importante du côté traité pourrait être la seule hypothèse qui permettrait subjectivement de désigner l'œil qui a bénéficié de la technique MICROELASTO. Par ailleurs, il est à souligner l'absence de réaction inflammatoire ce qui est tout à fait remarquable chez le lapin du fait de son extrême sensibilité.

L'innocuité du procédé MICROELASTO doit être retenue dans la limite de ses constatations basées sur la seule analyse histologique réalisée à l'aveugle.

*Ci-joint fichier photos en PDF.*

Fait à Bordeaux, le 31 janvier 2014

F. Léger MD, PhD



**GROUPE HOSPITALIER PELLEGRIN – ENFANTS**

Place Amélie Raba Léon – 33076 Bordeaux Cédex

Identification : 33 0 781360

Secrétariat : ☎ 05 56 79 55 89/05.56.79.59.04. (lignes directes) - Fax : 05 56 79 60 88.

Accueil – Réception des prélèvements : 15001

# Analyse histologique comparative à l'aveugle portant sur 10 paires d'yeux de lapin



TEST D'INNOCUITE MICROELASTO

**F. Léger MD, PhD**

F. Léger

1

- 
- Le test d'innocuité porte sur l'analyse histologique (cornée, cristallin, rétine) de 20 globes oculaires de 10 lapins.
  - Le protocole de recherche Microelasto n'a été appliqué qu'à un seul œil d'un même lapin et n'est pas connu du pathologiste.

F. Léger

2



## MATÉRIEL & MÉTHODE

Analyse histologique comparative de 20 globes oculaires provenant de 10 lapins identifiés par un numéro alpha numérique : numéro identique pour la même paire suivi de OD (œil droit) ou de OG (œil gauche)

Chaque globe oculaire fixé 48 heures dans le formol tamponné a fait l'objet de 2 prélèvements :

- \*une coupe sagittale médiane perpendiculaire à une ligne matérialisée par 2 points marqués au niveau de la conjonctive limbique par feutre noir diamétralement opposés passant par l'axe optique et permettant d'étudier la cornée et la rétine

- \*une coupe équatoriale du cristallin

Chaque prélèvement inclus en paraffine a fait l'objet d'une coupe de 3 µm suivie d'une coloration standard hématoxyline éosine safran

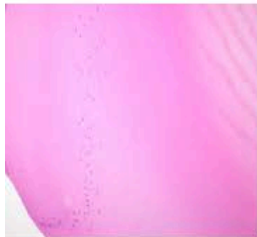
Microphotographies grossissement x10, x20, x40 réalisées sur les 20 cas à analyser.

Mesures particulières effectuées : épaisseur de la cornée de chaque cas et nombre de mitose présente au niveau de l'épithélium cornéen d'une extrémité limbique à l'autre.

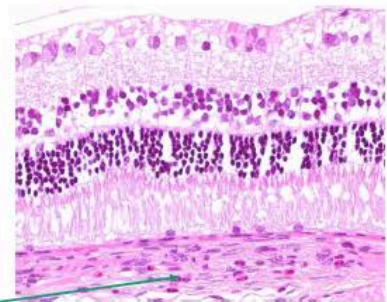
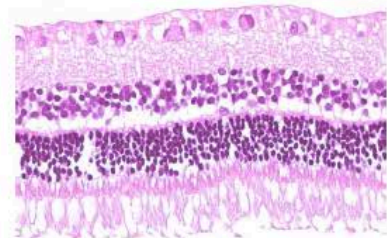
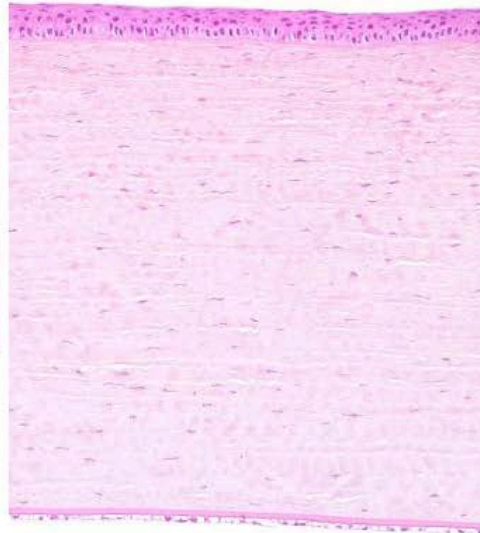
F. Léger

3

323507 OD



2 mitoses (épithélium cornéen)

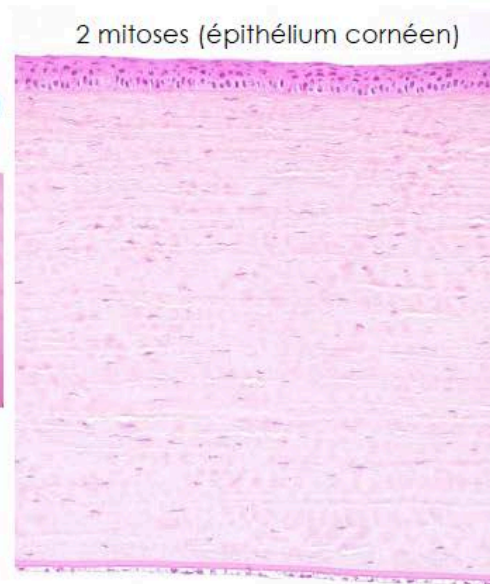
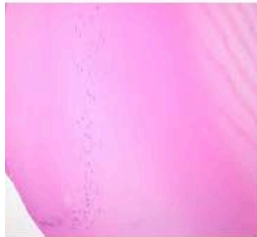


Polynucléaires éosinophiles choroïdiens

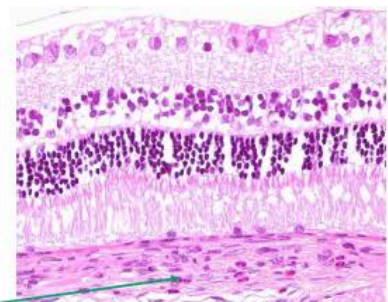
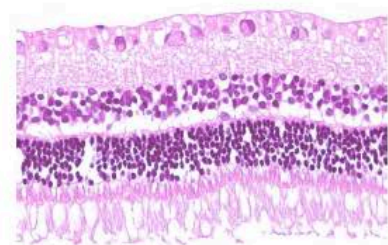
F. Léger

4

323507 OD



2 mitoses (épithélium cornéen)

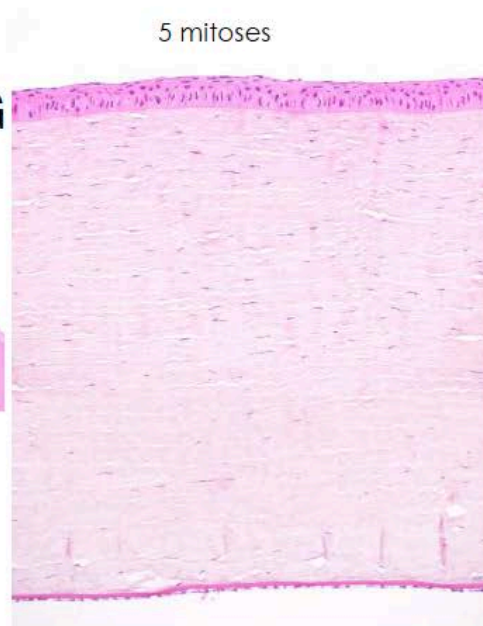
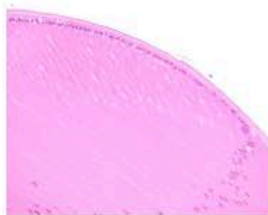


Polynucléaires éosinophiles choroïdiens

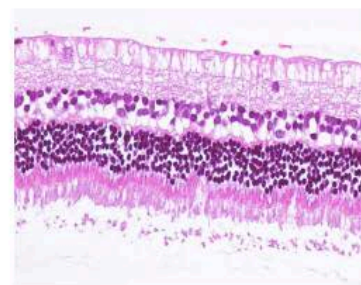
F. Léger

4

323507 OG



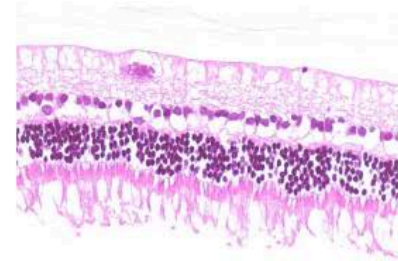
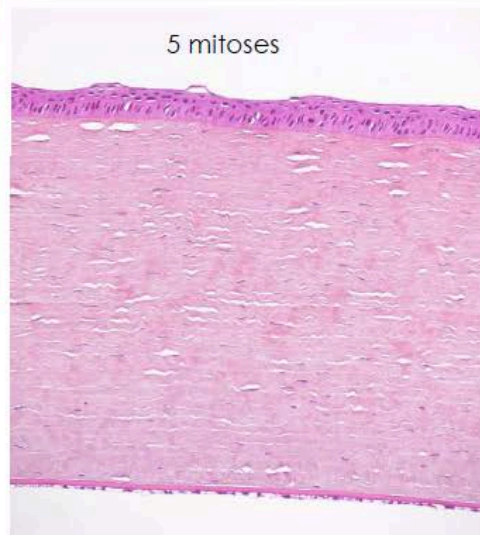
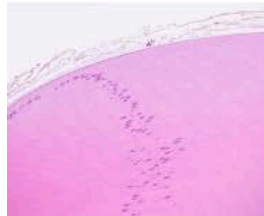
5 mitoses



F. Léger

5

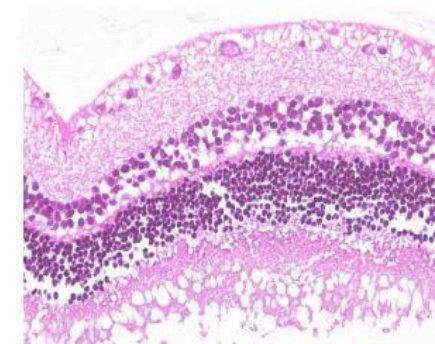
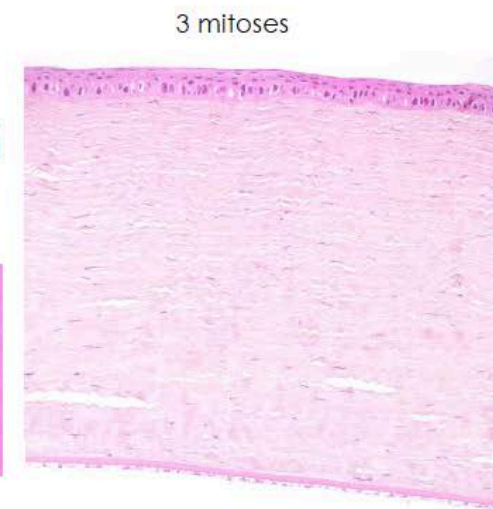
323509 OD



F. Léger

6

323509 OG

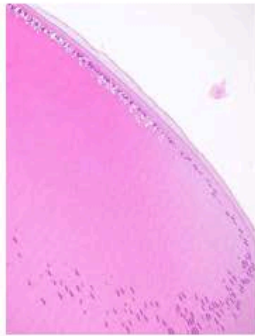


F. Léger

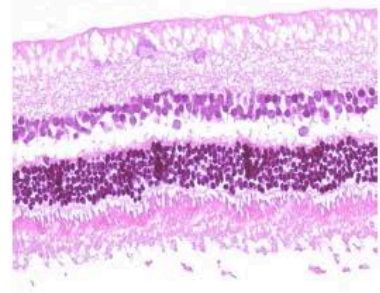
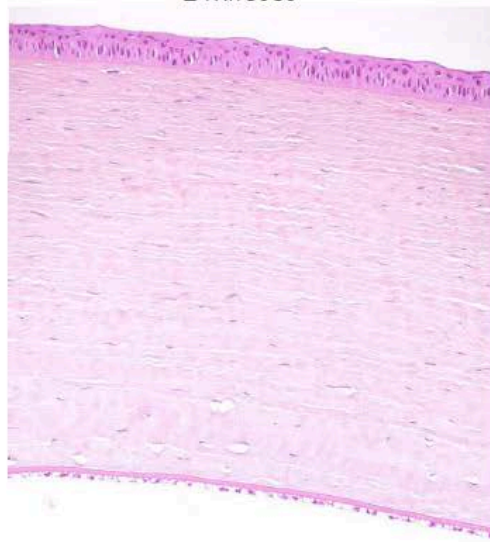
7



323542 OD



2 mitoses



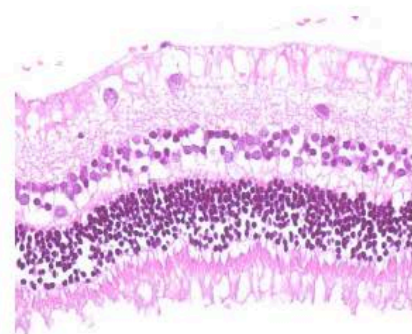
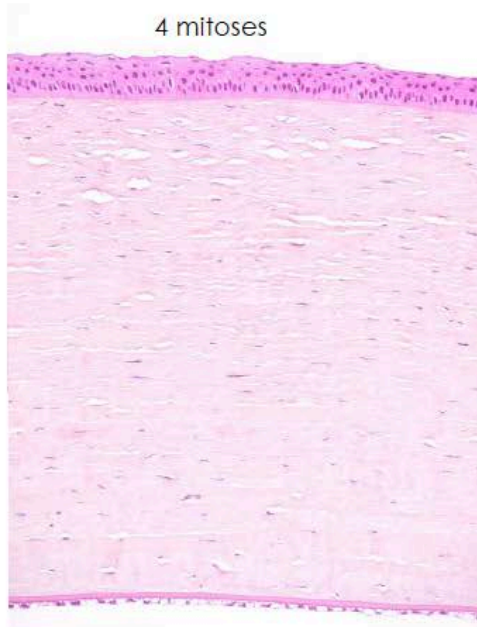
F. Léger

8

323542 OG



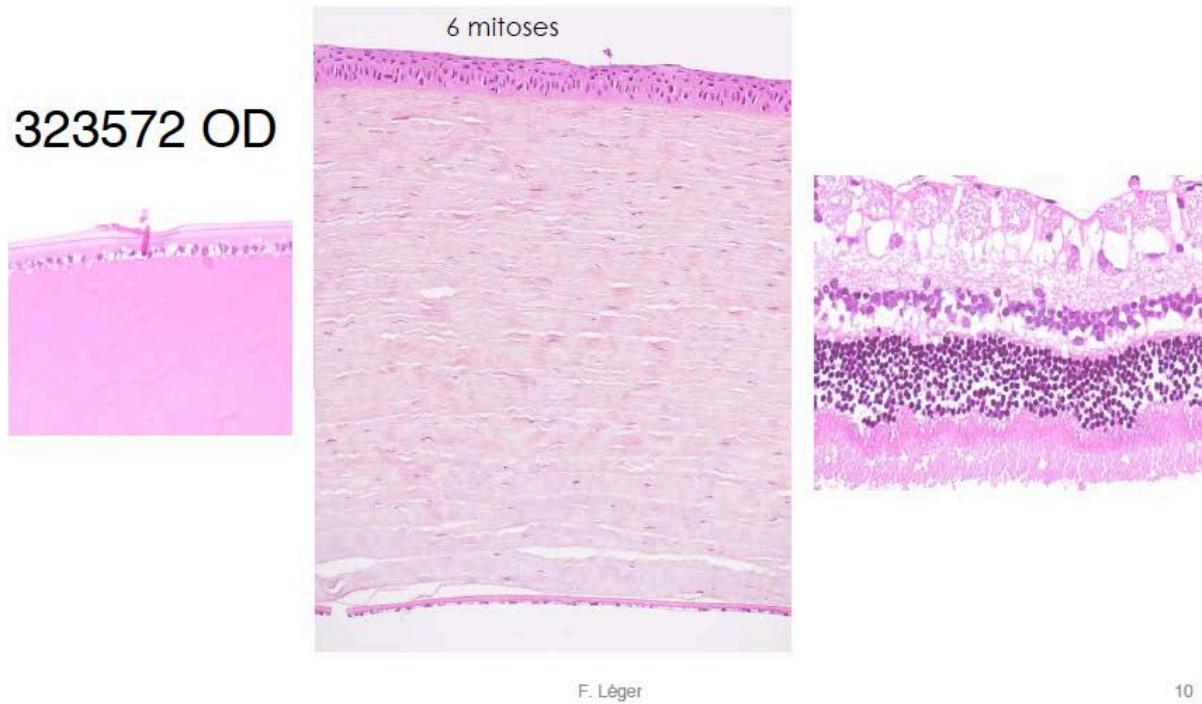
4 mitoses



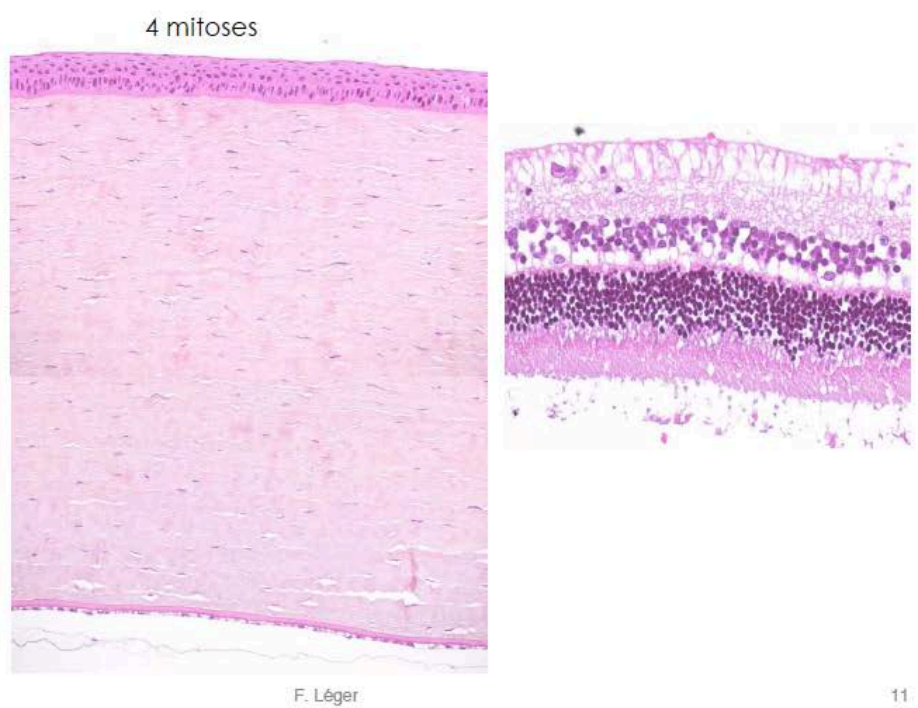
F. Léger

9

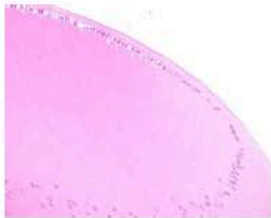
323572 OD



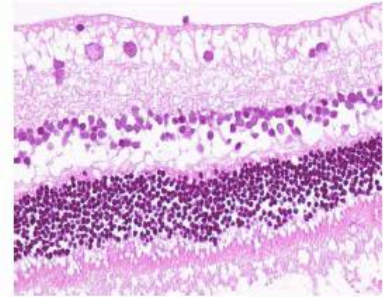
323572 OG



324644 OD



Pas de mitose



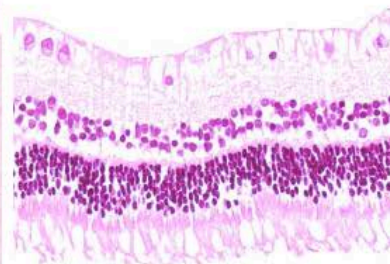
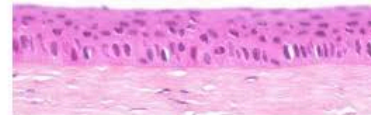
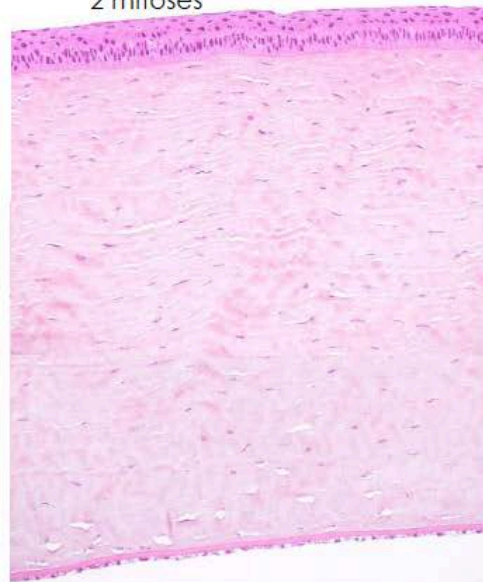
F. Léger

12

324644 OG



2 mitoses

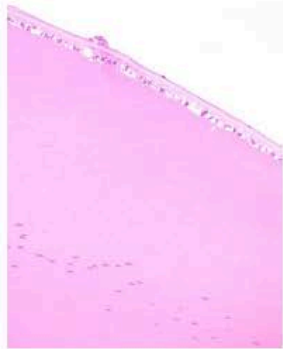


F. Léger

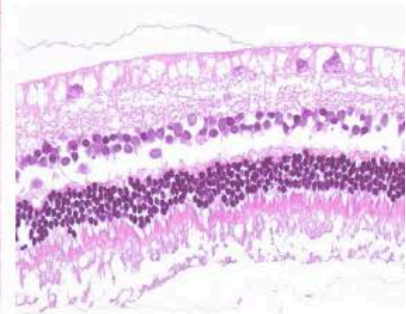
13



324565 OD

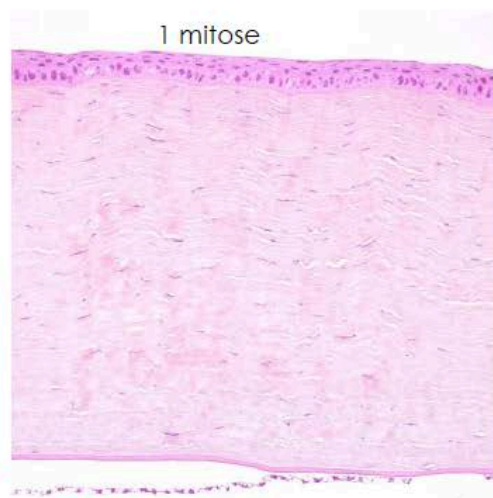


F. Léger

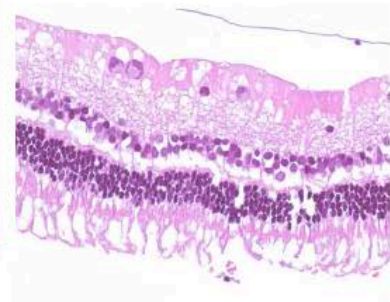


14

324565 OG

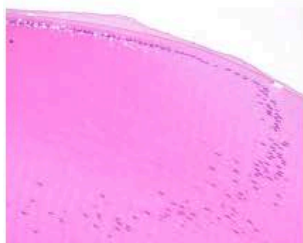


F. Léger

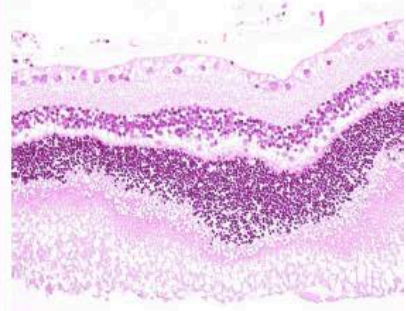
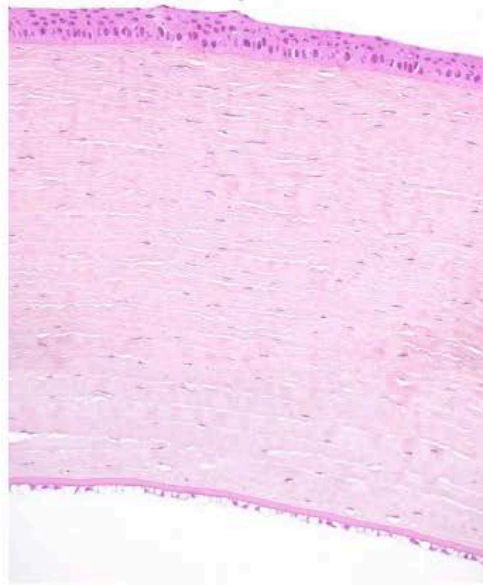


15

324629 OD



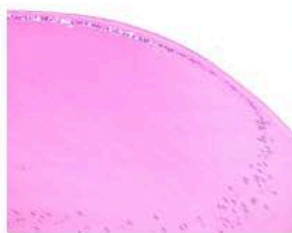
2 mitoses



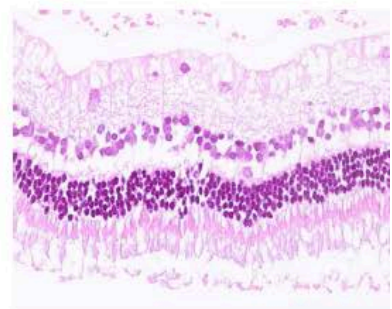
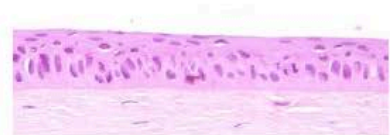
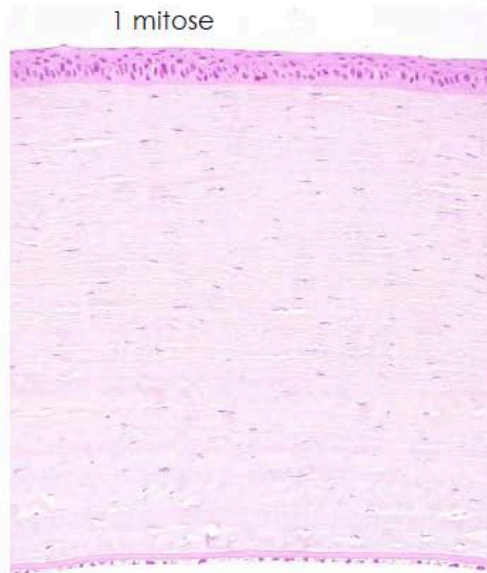
F. Léger

16

324629 OG



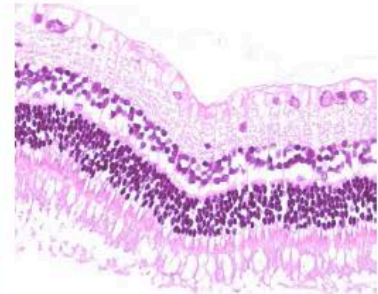
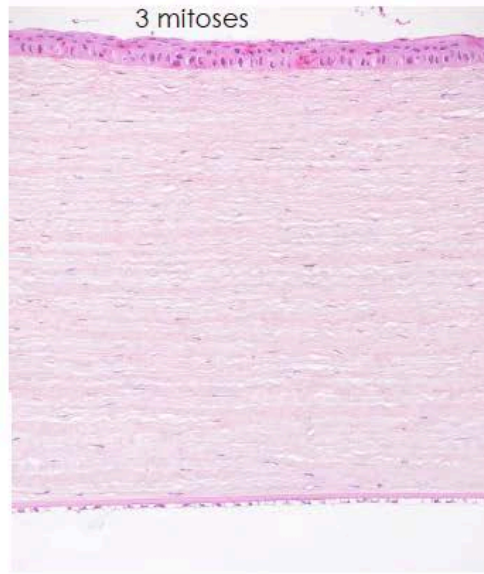
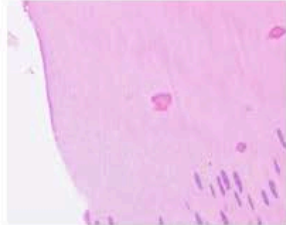
1 mitose



F. Léger

17

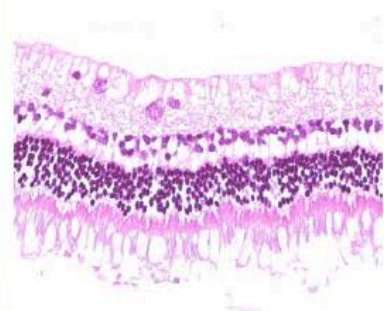
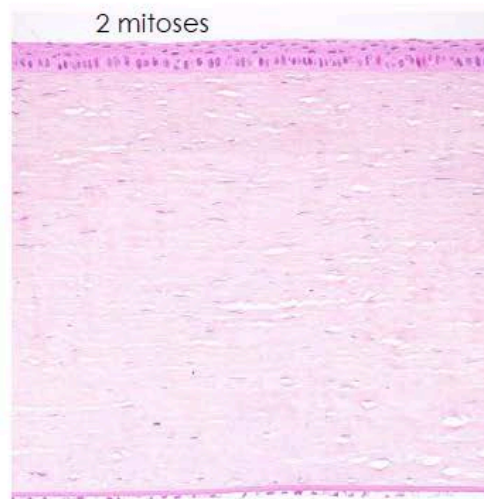
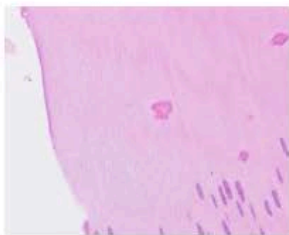
325524 OD



F. Léger

18

325524 OG

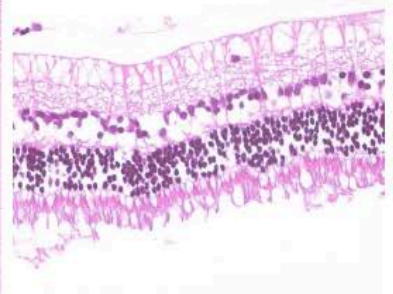
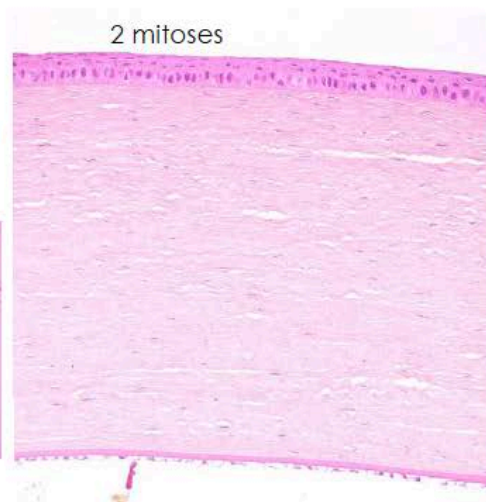
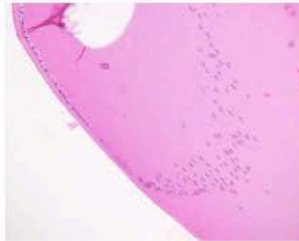


F. Léger

19



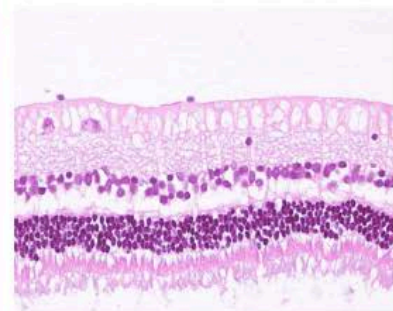
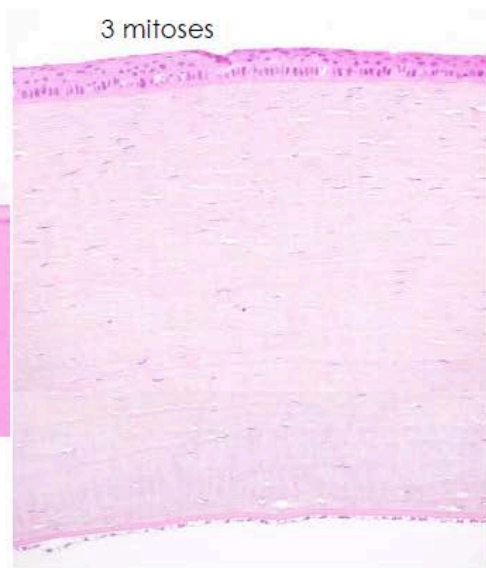
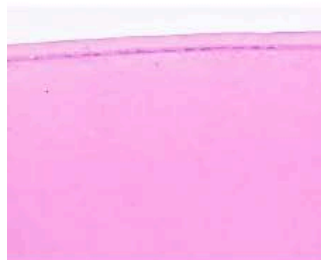
325527 OD



F. Léger

20

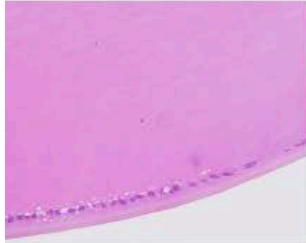
325527 OG



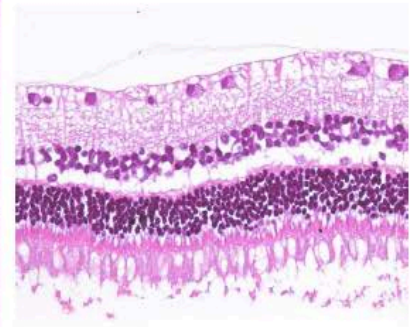
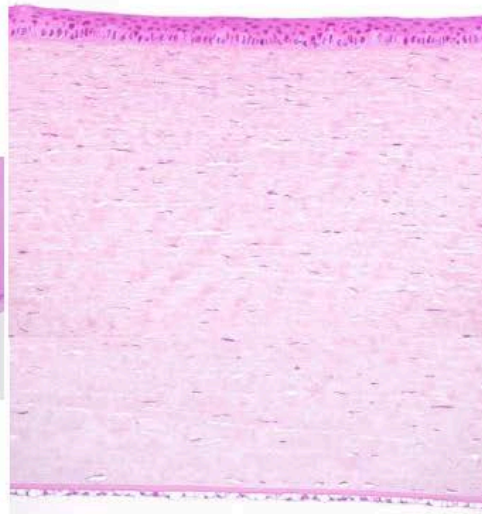
F. Léger

21

325613 OD



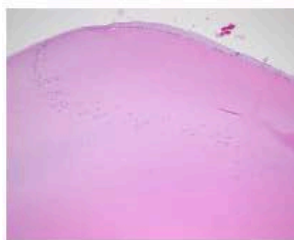
2 mitoses



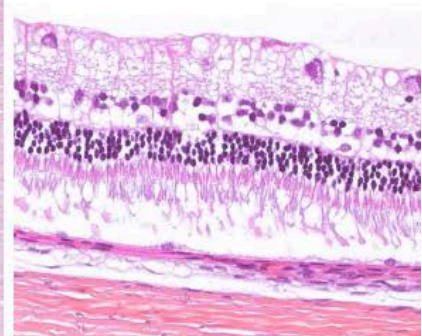
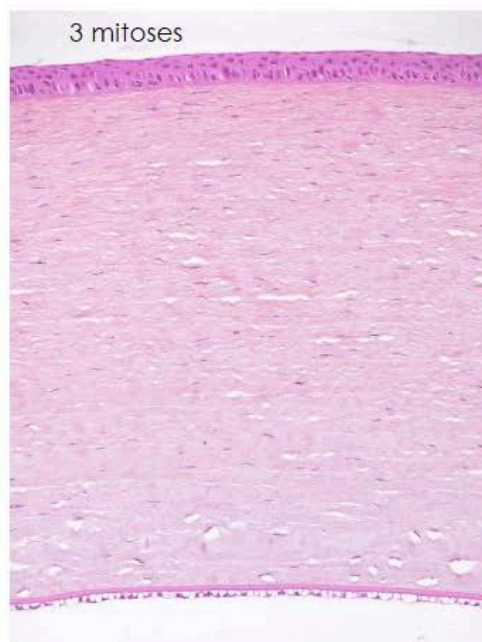
F. Léger

22

325613 OG



3 mitoses



F. Léger

23

## résultats cornées

- L'épaisseur moyenne de l'épithélium mesurée dans la partie centrale de la cornée s'établit à 621,5  $\mu\text{m}$  avec un écart type de 63 et des extrêmes [550-750]
- de même, le nombre d'assises cellulaires le plus faible rencontré au niveau de l'épithélium varie de 3 à 4 et ne permet pas de trouver une différence significative lorsqu'on compare à l'aveugle les 2 cornées d'un même propositus.
- Le stroma lamellaire ne présente pas d'anomalies particulières à savoir : inflammation, néo-vascularisation, apoptose des kératocytes.
- L'endothélium est le plus souvent vésiculeux, parfois décollé mais cela rentre dans le cadre des artefacts techniques.

F. Léger

24

## résultats

## cornées

N° œil	épaisseur $\mu\text{m}$	Mitose
323507 OD	650	2
323507 OG	600	5
323509 OD	500	5
323509 OG	650	3
323542 OD	600	2
323542 OG	630	4
323572 OD	720	6
323572 OG	750	4
324644 OD	600	0
324644 OG	630	2
324565 OD	700	2
324565 OG	550	1
324629 OD	660	2
324629 OG	550	1
325524 OD	650	3
325524 OG	570	2
325527 OD	560	2
325527 OG	610	3
325613 OD	670	2
325613 OG	600	3
Epais. moy.	621,5	2,7
ecartype	63,01	1,49

F. Léger

25

## résultats

### cornées

- L'activité mitotique au niveau de la basale épithéliale s'établit en moyenne à 2,7 images de mitose avec un écart type de 1,5 et des extrêmes [0-6].
- L'activité mitotique pourrait être le seul critère subjectif qui permettrait de distinguer l'œil qui a bénéficié du procédé Microelasto.
- Dans 5 paires, la différence du nombre de mitose est de 2 (seuil significatif) alors que dans les 5 autres paires la différence n'est que d'une seule mitose.

F. Léger

26

## résultats

### cristallin

- Il s'agit d'un tissu assez dur et les coupes histologiques sont le plus souvent difficiles à réaliser. Seul, le cristallin 323572 OG disloqué n'est pas interprétable.
- L'examen comparatif a porté sur la zone équatoriale.
- Une micro-vésiculation plus ou moins marquée des fibres cristalliniennes est souvent retrouvée mais là encore sur les 2 cristallins d'un même propositus.
- Il n'y pas d'inflammation, ni rupture capsulaire.

F. Léger

27



## résultats

### rétine

- La rétine examinée comparativement au voisinage du nerf optique ne montre pas de différences histologiques majeures.
- Il est également très difficile de parler d'hypoplasie ou d'hyperplasie de l'une des couches rétinienne.
- Aucun cas n'a montré une image de rétinite.
- Au niveau choroïdien, on remarque une certaine congestion sans que ce soit un critère discriminant. Un seul cas, 323507 OD, montre la présence focale de polynucléaires éosinophiles choroïdiens.

F. Léger

28

## Conclusion



F. Léger MD, PhD

- L'analyse histologique standard (cornée, cristallin et rétine) sur 20 globes oculaires de lapins ne montre pas de différences morphologiques entre les 2 globes oculaires d'un même lapin.
- L'hypothèse qu'une activité mitotique plus importante du côté traité permettrait de désigner l'œil qui a bénéficié de la technique MICROELASTO mais vérifiée subjectivement que dans 5 paires sur 10.
- Par ailleurs, il est à souligner l'absence de réaction inflammatoire ce qui est tout à fait remarquable chez le lapin du fait de son extrême sensibilité.
- L'innocuité du procédé MICROELASTO doit être retenue dans la limite de ses constatations basées sur la seule analyse histologique réalisée à l'aveugle.

F. Léger

29

## Lexique des Abréviations

AIC pour anneaux intra cornéens (soit *intra corneal ring segments* = ICRS)  
A-CXL pour CXL accéléré  
AFM pour microscopie à force atomique  
AOS pour aberrations optique d'ordre supérieur  
AOI pour aberrations optique d'ordre supérieur  
BAC ou BKC pour chlorure de Benzalkonium  
CXL pour *Corneal Collagen Cross-linking*  
C-CXL pour CXL Conventionnel  
CMI pour cornéoplasties mini invasives  
CO pour correction optique  
CH pour *corneal hysteresis*  
CTP pour *corneal thinnest point*  
CAA pour chambre antérieur artificielle  
CPP pour Comité de Protection des Personnes  
E pour module de Young  
EPL pour ectasie post laser excimer  
ESPI pour *Electronic speckle pattern interferometry*  
FFKC pour forme fruste de KC  
FDA pour *Food and Drug Administration*  
HAS pour coloration Hématéine Safran  
HPLC pour chromatographie en phase liquide à haute performance  
I-CXL pour CXL assisté par iontophorèse  
IOL pour *intra ocular lens*  
IR pour infra rouge  
KC pour Kératocône  
KCS pour KC Suspect  
K pour Module de Bluk  
KLAP pour kératoplastie lamellaire antérieure profonde  
LSH pour lentille souple hydrophile  
LRPG pour lentille rigide perméable au gaz  
LR pour lentille rigide  
LAF pour lampe à fente  
LASIK pour *LASer In situ Keratomileusis*  
MET pour microscopie électronique à transmission  
MEB pour microscopie électronique à balayage  
MRE pour élastographie par résonance magnétique  
MI pour *Mechanical Index*  
OCT pour *Optical Coherent Tomography*  
ORA pour *Ocular Response Analyzer*  
PIO pour pression intra oculaire  
PKR pour photokéractéctomie réfractive (soir PRK pour *photorefractive keratectomy*)  
PKT-te pour photokéractéctomie thérapeutique trans-épithéliale  
SAM pour *Scanning Acoustic Microscopy*  
SW pour *Shear Wave*  
SSI pour *Supersonic Shear wave Imaging*  
SHG pour *Second Harmonic Génération*  
SAM pour *Scanning Acoustic Microscopy*  
T-CXL pour CXL trans épithélial  
UV pour Ultra violet